

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-1680**
(22) Přihlášeno: **06.11.1998**
(30) Právo přednosti: **06.11.1997 DE 19971/9749122**
(40) Zveřejněno: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)
(47) Uděleno: **24.10.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **03.12.2008**
(Věstník č. 49/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/EP1998/007115**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/024593**

(13) Druh dokumentu **B6**

(51) Int. Cl.
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty

WO 96/21023; WO 94/14970; EP 0627490; DE 19617687.
Lüscher M. et al.: „Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*“, FEBS lett 385, 39-42, 1996

(73) Majitel patentu:

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.,
Berlin, DE

také způsobu in vitro výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož zbytky obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, pomocí FFT, a použití tohoto inulinu.

(72) Původce:

Heyer Arnd G., Berlin, DE
Hellwege Elke W., Berlin, DE
Gritscher Dominique, Berlin, DE

(74) Zástupce:

JUDr. Miloš Všečetka, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

Molekuly nukleové kyseliny kódující protein s enzymatickou aktivitou fruktosyltransferázy, vektor, hostitelská buňka, způsob přípravy FFT, FFT kódovaná molekulou nukleové kyseliny, způsob přípravy transformovaných hostitelských buněk, transformovaná hostitelská buňka, rostlina, množitelský materiál, sklizňové produkty, způsob výroby vysokomolekulárního inulinu, a použití vysokomolekulárního inulinu

(57) Anotace:

Molekuly nukleové kyseliny kódující proteiny s enzymatickou aktivitou fruktosyltransferázy (FFT) vedoucí k syntéze vysokomolekulárních fruktanových polymeru, jejichž molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, přičemž molekuly nukleové kyseliny jsou vybrány ze skupiny definované v popisu. Dále se toto řešení týká vektoru obsahujícího tyto molekuly nukleové kyseliny, hostitelských buněk transformovaných těmito molekulami nukleové kyseliny, zejména transgenních rostlinných buněk, rostlinných pletiv a rostlin, dále množitelského materiálu a sklizňových produktů, a způsobu přípravy těchto transformovaných hostitelských buněk. Kromě toho se týká způsobu přípravy FFT a FFT kódované molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu, výroby transgenních rostlin, které syntetizují inulin s dlouhým řetězcem díky zavedení molekul DNA kódujících FFT; způsobu výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož zbytky obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, v různých hostitelských organismech, zejména rostlinách, a

Molekuly nukleové kyseliny kódující protein s enzymatickou aktivitou fruktosyltransferázy, vektor, hostitelská buňka, způsob přípravy FFT, FFT kódovaná molekulou nukleové kyseliny, způsob přípravy transformovaných hostitelských buněk, transformovaná hostitelská buňka, rostlina, množitelský materiál, sklizňové produkty, způsob výroby vysokomolekulárního inulinu, a použití vysokomolekulárního inulinu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká molekul nukleové kyseliny kódujících proteiny, které mají enzymatickou fruktosyl-transferázovou (FFT) aktivitu. Dále se tento vynález týká vektorů obsahujících tyto molekuly nukleové kyseliny, hostitelských buněk transformovaných těmito molekulami nukleové kyseliny, zejména transgenních rostlinných buněk, rostlinných pletiv a rostlin, dále množitelského materiálu a sklizňových produktů, a dále způsobu přípravy těchto transformovaných hostitelských buněk. Kromě toho se vynález týká způsobu přípravy FFT a FFT kódované molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu. Dále se předmětný vynález týká produkce transgenních rostlin, které syntetizují inulin s dlouhým řetězcem díky zavedení molekul DNA kódujících FFT. Předkládaný vynález se také týká způsobu výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož zbytky obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, v různých hostitelských organismech, zejména rostlinách, způsobu *in vitro* výroby tohoto vysokomolekulárního inulinu pomocí FFT podle vynálezu, a použití tohoto vysokomolekulárního inulinu.

Dosavadní stav techniky

Lineární, ve vodě rozpustné polymery mají velmi široké spektrum aplikací, například jich lze užít ke zvýšení viskozity vodných systémů, jako detergentů, jako suspenzačních činidel nebo pro urychlení sedimentačního procesu a pro komplexování, ale také pro vázání vody. Polymery na bázi sacharidů, například fruktosylové polysacharidy, jsou obzvláště zajímavé materiály, protože jsou biologicky odbouratelné (biodegradovatelné).

Kromě jejich využití jako obnovitelné suroviny pro průmyslovou produkci a zpracování, jsou fruktosylové polymery také zajímavé jako potravinová aditiva, například jako umělá sladidla. Pro různé aplikace jsou potřeba polymery s různou délkou řetězce. Zatímco polymery s krátkým nebo středně dlouhým řetězcem jsou výhodné v potravinářském průmyslu, polymery s vysokým stupněm polymerizace (DP) jsou užitečné pro technické účely, jako je například výroba surfaktantů (povrchově aktivních látek).

Doposud byly popsány pouze způsoby produkce fruktanových polysacharidů s dlouhým řetězcem v rostlinách pomocí exprese enzymů fruktosyltransferáz bakteriálního původu. Většina bakteriálních fruktosyltransferáz syntetizuje levan, fruktosylový polymer vázaný β -2,6 vazbou, který má četná β -2,1 větvení. Toto větvení představuje z technického hlediska značnou nevýhodu a proto je levan jakožto technický materiál podstatně méně významný než inulin.

Dosud je znám pouze jeden bakteriální gen, jehož produkt se účastní syntézy inulinu, a sice gen *ftf* ze *Streptococcus mutans*. V principu je možné exprimovat gen v rostlinách, pokud by byl získán a upraven metodami genového inženýrství. Avšak výtěžek inulinu z transgenních rostlin je tak nízký, že ekonomicky výhodné využití takových transgenních rostlin nepřípadá v úvahu.

Dále je také znám způsob přípravy transgenních rostlin exprimujících fruktosyltransferázy z *Helianthus tuberosus*. Expres těchto genů v transgenních rostlinách vede k tvorbě inulinu s průměrným stupněm polymerizace DP = 6 až DP = 10. Polymery s tímto stupněm polymerizace nelze považovat za inulin s dlouhým řetězcem. Inulin s průměrným stupněm polymerizace DP = 6 až DP = 10 však není vhodný pro většinu technických aplikací.

Způsoby produkce inulinu s dlouhým řetězcem v rostlinách nebo způsoby přípravy vhodných enzymů pro syntézu inulinu nejsou dosud známy.

Patentová přihláška PCT/US89/02729 popisuje možnost tvořit cukerné polymery, zejména dextran nebo polyfruktózu, v transgenních rostlinách, obzvláště v plodech transgenních rostlin. Pro přípravu takových modifikovaných rostlin se navrhovalo použití levansacharózy z mikroorganismů, konkrétně z *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius* a *Bacillus subtilis*, nebo dextransacharózy z *Leuconostoc mesenteroides*. Avšak nikde nebyla popsána ani produkce aktivních enzymů, ani levanu či dextranu a ani příprava transgenních rostlin. Patentová přihláška PCT/EP93/02110 popisuje způsob produkce transgenních rostlin exprimujících gen *lsc* levansacharózy z gramnegativní bakterie *Erwinia amylovora*. V patentové přihlášce PCT/NL93/00279 je popsána transformace rostlin majících chimérické geny, které obsahují gen *sacB* z *Bacillus subtilis* nebo gen *ftf* ze *Streptococcus mutans*. Transgenní rostliny exprimující gen *SacB* tvoří rozvětvený levan. Transgenní rostliny exprimující gen *ftf* syntetizují vysokomolekulární inulin, avšak výnos je tak nízký, že ekonomické využití nepřichází v úvahu.

Patentová přihláška PCT/NL96/00012 popisuje sekvence DNA kódující enzymy syntetizující cukerné polymery a produkci transgenních rostlin s pomocí těchto sekvencí DNA. Popisované sekvence pocházejí z *Helianthus tuberosus*. Podle dokumentu PCT/NL96/00012 jsou popsány sekvence vhodné nejenom k modifikaci fruktanového profilu například petúnie a brambory, ale také samotné *Helianthus tuberosus*. Když se v transgenní rostlině exprimuje gen SST a FFT, může se tvořit inulin. Průměrný stupeň polymerizace inulinu je však v rozmezí $PD = 6$ až $PD = 10$. Produkce vysokomolekulárního inulinu není možná způsoby, které byly popsány v PCT/NL96/00012. Přihláška PCT/EP97/02195 popisuje způsob přípravy transgenních rostlin tvořících inulin pomocí genu *ftf* ze *Streptococcus mutans*. Výtěžek vysokomolekulárního inulinu je však nízký, jak tomu bylo i u rostlin popsanych v přihlášce PCT/NL93/00279. Přihláška DE 19708 744.4 popisuje produkci inulinu s krátkým řetězcem pomocí enzymu, který vykazuje fruktosylpolymerázovou aktivitu. Inulin s krátkým řetězcem lze připravit v transgenních rostlinách. Výtěžek inulinu s krátkým řetězcem je velký a u brambor odpovídá buněčnému obsahu sacharózy. Produkce inulinu s dlouhým řetězcem však nebyla popsána.

Podle dosavadního stavu techniky byla syntéza inulinu u rostlin důkladně zkoumána (Pollock a Chatteron, *Fructans, The biochemistry of Plants, Vol. 14, 1988, Academic Press, str. 109-140*). Avšak přirozeně se v rostlinách vyskytující inulin je inulin s krátkým řetězcem s maximálním stupněm polymerizace přibližně $DP = 35$ (viz výše publikace Pollock a Chatteron). Syntéza a metabolismus fruktanů v rostlinách vyžadují aktivitu alespoň třech enzymů: sacharózofruktosyltransferázy závislé na sacharóze (SST), která tvoří trisacharidovou kestózu, fruktanfruktosyltransferázy závislé na fruktanu (FFT), která přenáší fruktosylový zbytek z fruktanových molekul s nejmenším stupněm polymerizace $DP = 3$ (kestóza) na sacharózu a vyšší fruktany, a fruktanexohydrolázy (FEH), která odstraňuje fruktózové zbytky z fruktanových molekul. Není známo, zda rozdíly v průměrné molekulové hmotnosti inulinu z různých rostlinných druhů, např. 2×10^3 v případě *Allium cepa* a 5×10^3 v případě *Helium tuberosum*, vycházejí z rozdílných vlastností jejich SST, FFT a FEH.

Z tohoto důvodu není možné vzhledem k současným znalostem týkajícím se syntézy inulinu u rostlin identifikovat vhodné DNA sekvence, jejichž pomocí by mohl být syntetizován vysokomolekulární inulin v rostlinách v ekonomicky zajímavých množstvích.

Proto je cílem předkládaného vynálezu poskytnout molekulu nukleové kyseliny a způsoby, které umožní připravit geneticky modifikované organismy, zejména rostliny, schopné tvořit inulin s dlouhým řetězcem.

Výše zmíněný problém je řešen předkládaným vynálezem, který je popsán pomocí následujících příkladů provedení a definován patentovými nároky.

Podstata vynálezu

Podstatu předmětného vynálezu tvoří molekuly nukleové kyseliny kódující protein s enzymatic-
 5 kovou aktivitou fruktosyltransferázy (FFT) vedoucí k syntéze vysokomolekulárních fruktanových
 polymerů, jejichž molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, přičemž
 molekuly nukleové kyseliny jsou vybrány ze skupiny zahrnující:

(a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvede-
 10 nou jako id. č. 2 a id. č. 4;

(b) molekuly nukleové kyseliny obsahující kódující sekvenci uvedenou jako id. č. 1 nebo id. č. 3,
 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci;

(c) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci přinejmenším z 80 % identic-
 15 kou s kódující sekvencí uvedenou v id. č. 1;

(d) molekuly nukleové kyseliny kódující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci přinej-
 20 menším z 85 % identickou s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v id. č. 2; a

(e) molekuly nukleové kyseliny obsahující fragment nukleotidové sekvence z části (a), (b), (c)
 nebo (d).

Výhodná je podle vynálezu molekula nukleové kyseliny, která obsahuje nukleotidovou sekvenci
 25 z více než 90 % identickou s kódující sekvencí uvedenou v id. č. 1. Dále je výhodná molekula
 nukleové kyseliny, kde aminokyselinová sekvence kóduvaného proteinu je z více než 90 % iden-
 tická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2, podle ještě výhodnějšího provedení z více než 95 %
 identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2, podle ještě výhodnějšího provedení z více než
 97 % identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2, a podle nejvýhodnějšího provedení z více
 30 než 99 % identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2. Výhodně je molekulou nukleové kyseli-
 ny molekula DNA, nejvýhodněji molekula cDNA, nebo molekula RNA. Molekula nukleové
 kyseliny nejlépe pochází z artyčoku.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží vektor obsahující libovolnou výše specifikova-
 35 nou molekulu nukleové kyseliny. Výhodný je vektor, kde molekula nukleové kyseliny je opera-
 tivně spojena s regulačními prvky, které zajišťují transkripci a syntézu translatovatelné RNA
 v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách, výhodně jsou tyto regulační prvky odvozeny
 z promotoru B33 genu patatinu nebo promotoru 35S CaMV.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží hostitelská buňka transformovaná libovolnou
 40 výše specifikovanou molekulou nukleové kyseliny nebo libovolným výše specifikovaným vektor-
 em, nebo buňka, která je odvozena z takové buňky, kde tyto odvozené buňky obsahují uvedenou
 molekulu nukleové kyseliny nebo uvedený vektor. Výhodně tato hostitelská buňka navíc obsahu-
 je gen kódující sacharózofruktosyltransferázu (SST) závislou na sacharóze.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob přípravy FFT, jehož podstata spočívá
 45 v tom, že se výše specifikované hostitelské buňky kultivují v podmínkách, které umožňují synté-
 zu FFT a pak se FFT izoluje z kultivovaných buněk a/nebo kultivačního média.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží FFT kóduvaná libovolnou výše specifikovanou
 50 molekulou nukleové kyseliny nebo připravená výše definovaným způsobem.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob přípravy transformovaných hostitels-
 55 kých buněk, zejména transgenních rostlinných buněk, transgenních rostlinných pletiva transgen-
 ních rostlin, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje krok, kdy se vnese molekula libovolné

výše specifikované nukleové kyseliny nebo výše specifikovaný vektor do hostitelské buňky, rostlinné buňky, rostlinného pletiva nebo rostliny.

5 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží transformovaná hostitelská buňka, transgenní rostlinná buňka, rostlinné pletivo nebo rostlina, které obsahují libovolnou výše specifikovanou molekulu nukleové kyseliny nebo vektor nebo které jsou připraveny výše uvedeným způsobem nebo které jsou odvozeny z takových buněk, pletiv nebo rostlin, kde uvedená odvozená buňka, pletivo nebo rostlina obsahuje uvedenou molekulu nukleové kyseliny nebo uvedený vektor.

10 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží transformovaná hostitelská buňka, transgenní rostlinná buňka, rostlinné pletivo nebo rostlina, které navíc obsahují gen kódující sacharózo-fruktosyltransferázu (SST) závislou na sacharóze.

15 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží rostlina obsahující výše specifikované rostlinné buňky nebo rostlinné pletivo.

Výhodně je touto rostlinou užitková rostlina, nejvýhodněji se jedná o rostlinu obsahující sacharózu.

20 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží množitelský materiál libovolné z výše specifikovaných rostlin obsahující libovolné z výše specifikovaných rostlinných buněk.

25 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží sklizňové produkty libovolných z výše specifikovaných rostlin obsahující libovolné z výše specifikovaných rostlinných buněk.

Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje

30 (a) kultivaci libovolné výše specifikované transformované hostitelské buňky, transgenní rostlinné buňky nebo rostlinného pletiva nebo rostliny za podmínek, které umožňují tvorbu FFT a přeměnu 1-kestózy, případně dodávané zvenčí, nebo ekvivalentního substrátu, na tento vysokomolekulární inulin, a

35 (b) izolování takto vytvořeného inulinu z kultivovaných buněk, pletiv nebo rostlin nebo z kultivačního média.

40 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob výroby vysokomolekulárního inulinu jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje

(a) přivedení 1-kestózy nebo ekvivalentního substrátu do kontaktu s FFT za podmínek, které umožňují přeměnu na tento vysokomolekulární inulin, a

45 (b) izolování takto vytvořeného inulinu.

50 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží způsob *in vitro* výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, jehož podstata spočívá v tom, že se sacharóza jakožto substrát přemění na vysokomolekulární inulin působením kombinace enzymů obsahující SST a FFT.

55 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží použití vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, připraveného z libovolné výše specifikované hostitelské buňky, rostlinné buňky nebo rostlinného pletiva, rostliny, množitelského materiálu nebo ze sklizňového produktu, nebo za pomoci libovolného z výše specifikovaných

vaných způsobů, k výrobě surfaktantů ke zvýšení viskozity vodných systémů, jako detergentu, suspenzačního činidla, pro urychlení sedimentace a pro komplexování nebo vázání vody.

5 Ve smyslu předkládaného vynálezu znamená, že enzym mající fruktosyltransferázovou aktivitu (FFT) je protein, který je schopný katalyzovat vznik β -2,1 glykosidické a/nebo β -2,6-glykosidické vazby mezi fruktózovými jednotkami. Fruktosylový zbytek, který má být přenesen, může pocházet z 1-kestózy nebo fruktanového polymeru.

10 Vysokomolekulárním fruktosylovým polymerem se ve smyslu předkládaného vynálezu rozumí molekula obsahující v průměru více než 20, výhodně více než 25 a ještě výhodněji nejméně 32 fruktosylových zbytků. Navíc se ve smyslu předkládaného vynálezu vysokomolekulárním fruktosylovým polymerem rozumí molekula obsahující v průměru méně než 3000, výhodněji méně než 300 a zvláště výhodně méně než 100 fruktosylových zbytků. Fruktosylové zbytky jsou spojeny buď β -2,1 nebo β -2,6-glykosidickou vazbou. V případě inulinu jsou zbytky obecně
15 navázány β -2,1-glykosidickými vazbami. V malé míře se vyskytují také β -2,6-glykosidické vazby, v méně než 5 % případů, výhodně méně než ve 3 %, výhodněji méně než v 1,5 % a nejvýhodněji méně než v 0,5 % případů. Fruktosylový polymer může nést na svém konci glukózový zbytek, který je spojen prostřednictvím OH skupiny na atomu C-1 glukózy a OH skupiny atomu C-2 fruktosylového zbytku. V takovém případě fruktosylový polymer obsahuje také molekulu
20 sacharózy.

Podle vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že během exprese molekul nukleové kyseliny podle vynálezu se v transgenních rostlinách tvořila velká množství inulinu. Inulin tvořený v rostlinách měl průměrný stupeň polymerizace zřetelně vyšší než DP = 20. To bylo neočekávané, neboť
25 podobný enzym z *Helianthus tuberosus* se podílí na syntéze inulinu s průměrným stupněm polymerizace nižším než DP = 20 v transgenních rostlinách (viz PCT/NL96/00012).

Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být jak DNA, tak RNA molekuly. Vhodné molekuly DNA jsou například molekuly genomové DNA nebo cDNA. Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být izolovány z přírodních zdrojů, výhodně artyčoku, nebo mohou
30 být syntetizovány pomocí známých metod.

Prostřednictvím obvyklých molekulárně biologických metod je možné (viz např. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) zavést do molekul nukleové kyseliny podle vynálezu odlišné mutace, což vede k tomu, že takto je možné syntetizovat proteiny s modifikovanými biologickými
35 vlastnostmi. Na jedné straně je tu možnost vytvářet deleční mutanty, kdy se tvoří molekuly nukleové kyseliny postupujícími delecemi od 5'- nebo 3'-konce kódující sekvence DNA. Tyto nukleové kyseliny pak poskytují syntézu proteinů, které jsou adekvátně zkráceny. Takovými delecemi na 5'-konci nukleotidové sekvence je například možné identifikovat aminokyselinové sekvence, které jsou odpovědné za translokaci enzymu v plastidech (tranzitní peptidy). To umožňuje specifickou produkci enzymů, které díky odstranění příslušných sekvencí nejsou již nadále
40 lokalizovány ve vakuolách, ale v cytosolu, nebo které jsou díky připojení dalších signálních sekvencí lokalizovány v jiných kompartmentech.

45 Na druhé straně další možností je zavedení bodové mutace na pozici, kde modifikace aminokyselinové sekvence ovlivňuje například enzymovou aktivitu nebo regulaci enzymu. Tímto způsobem mohou být například tvořeny mutanty, které mají změněnou hodnotu K_m nebo které již nadále nepodléhají regulačním mechanismům, které normálně v buňce existují, jako jsou například
50 alosterické regulace nebo kovalentní modifikace.

Kromě toho mohou být tvořeny mutanty, které vykazují změněnou substrátovou specifitu nebo specifitu pro produkt. Mohou být také tvořeny mutanty, které vykazují změněný profil aktivita-
55 teplota.

Pro manipulaci v prokaryotických buňkách metodami genetického inženýrství mohou být molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu nebo části těchto molekul zavedeny do plazmidů umožňujících mutagenезi nebo modifikaci sekvence rekombinací sekvence DNA. Prostřednictvím standardních metod (*Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*) se mohou zaměňovat báze a mohou být přidávány přirozené nebo syntetické sekvence. Aby se fragmenty DNA navzájem spojily, mohou k nim být přidány speciální adaptační nebo spojovací sekvence, adaptéry nebo spojky (linkery). Mimoto se mohou provádět manipulace, které poskytují vhodná štěpná místa nebo které odstraňují přebytnou DNA nebo nadbytečná štěpná místa. Jsou-li možné inserce, delece nebo substituce, může se provádět *in vitro* mutagenезe, náhrada pomocí primeru, restrikce nebo ligace. Jako metody analýzy se obvykle používají sekvenční analýza, restrikční analýza a další biochemické nebo molekulárně biologické metody.

Termín „hybridizace“ má ve smyslu tohoto vynálezu význam hybridizace za obvyklých hybridizačních podmínek, výhodně za stringentních podmínek, jak je například popsáno v *Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*. Příkladem hybridizace ve stringentních podmínkách je hybridizace v podmínkách definovaných takto: 50% formamid, 5x SSC, 5x Denhardtův roztok, 40 mM fosforečnan sodný pH 6,8, 0,5% (hmot./objem) BSA, 1% (hmot./objem) SDS, 0,1 mg/ml DNA ze spermatu sledů, a to při 42 °C. Příkladem obvyklé hybridizace v non-stringentních podmínkách je hybridizace v podmínkách definovaných stejně jako viz výše, s tím rozdílem, že místo 50% je užito 30% formamid. Promývací podmínky jsou v případě stringentních podmínek výhodně 0,5x SSC/0,5% SDS při 60 °C a v případě non-stringentních podmínek výhodně 2x SSC/0,5% SDS při 56 °C.

Molekuly nukleové kyseliny, které hybridizují s molekulami podle vynálezu, mohou být izolovány například z genomových nebo cDNA knihoven, které byly připraveny z odpovídajících organismů, například z artyčoku.

K identifikování a izolování takovýchto molekul nukleové kyseliny mohou být použity molekuly podle vynálezu nebo části těchto molekul nebo reverzní komplementy těchto molekul, například získané hybridizací pomocí obvyklých metod (viz například *Sambrook a kol., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*).

Jako hybridizační sonda mohou být například použity molekuly nukleové kyseliny, jejichž nukleotidová sekvence je zcela shodná nebo v podstatě podobná sekvenci uvedené zde jako sekvence id. č. 1 nebo sekvence id. č. 3, nebo části těchto sekvencí. Fragmenty použité jako hybridizační sondy mohou být syntetické fragmenty, které byly vytvořeny prostřednictvím obvyklých způsobů syntézy, a jejichž sekvence jsou v podstatě podobné sekvencím molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu.

Molekuly hybridizující s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu také zahrnují fragmenty, deriváty a alelické varianty molekul nukleové kyseliny popsanych výše kódujících protein podle vynálezu. Termínem „fragmenty“ se míní části molekul nukleové kyseliny, které jsou dostatečně dlouhé, aby kódovaly jeden z proteinů podle vynálezu. Termín „derivát“ v tomto smyslu znamená, že se sekvence těchto molekul liší od sekvencí molekul nukleové kyseliny popsanych výše v jedné nebo několika pozicích, avšak s těmito sekvencemi mají vysoký stupeň homologie. Homologie znamená sekvenční identitu alespoň 40 %, zejména alespoň v 60 %, výhodně více než 80 % a nejvýhodněji více než 90 %. Proteiny kódované takovými molekulami nukleové kyseliny mají sekvenci identickou s aminokyselinovou sekvencí uvedenou jako sekvenci id. č. 2 alespoň v 80 %, výhodně v 85 % a zejména výhodně ve více než 90 %, 95 %, 97 % a 99 %. Odchyly od výše popsanych molekul nukleové kyseliny mohou být tvořeny delecí, substitucí, insercí nebo rekombinací.

Molekuly nukleové kyseliny, které jsou homologní s výše popsányými molekulami, a které představují deriváty těchto molekul, jsou obvykle varianty těchto molekul, které představují modifikace mající tutéž biologickou funkci. Mohou to být přirozeně se vyskytující varianty, například sekvence z jiných organismů nebo mutace, které mohou vzniknout buď přirozeně nebo které byly vneseny specifickou mutagenézí. Kromě toho mohou být tyto varianty synteticky vytvořené sekvence. Alelické varianty mohou být buď přirozeně se vyskytující varianty nebo synteticky vytvořené varianty nebo varianty vytvořené metodami rekombinantní DNA.

Proteiny kódované různými variantami molekul nukleové kyseliny podle vynálezu vykazují určité společné vlastnosti, jako je enzymová aktivita, molekulová hmotnost, imunologická reaktivita nebo konformace, či fyzikální vlastnosti, jako je elektroforetická pohyblivost, chování při chromatografii, sedimentační koeficienty, rozpustnost, spektroskopické vlastnosti, stabilita, optimum pH, teplotní optimum.

Jak již bylo uvedeno, ve výhodném provedení jsou nukleové kyseliny podle vynálezu získány z artyčoku (*Cynara scolymus*).

Pokud se týče vektorů obsahujících molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, výhodně se jedná o plazmidy, kosmidy, víry, bakteriofágy a další vektory obvykle používané v oboru genového inženýrství.

Ve vektoru podle vynálezu je sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu výhodně operativně spojena s regulačními prvky, což zaručuje transkripci a syntézu RNA v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách, která může být translatována.

Expresní vektory podle vynálezu umožňují produkci inulinu s dlouhým řetězcem v různých hostitelských organismech, zejména v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách jako jsou bakterie, houby, řasy, buňky živočichů a výhodně rostlinné buňky a rostliny. Výhodné hostitelské organismy jsou zvláště kvasinky jako například *S. cerevisiae*, bakterie mléčného kvašení jako *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *Lactobacillus acidophilus* a *Leuconostoc cremoris*.

Kódované enzymy mohou být použity pro produkci inulinu s dlouhým řetězcem také mimo hostitelské organismy. Zvláště výhodné jsou rostlinné buňky.

Přehled týkající se různých expresních systémů lze najít např. v publikacích *Methods in Enzymology* 153, 1987, 385–516, Bitter a kol., *Methods in Enzymology* 153, 1987, 516–544, Savers a kol., *Applied Microbiology and Biotechnology* 465, 1996, 1–9, Billman Jacobe, *Current Opinion in Biotechnology* 7, 1996, 500–504, Hockeny, *Trends in Biotechnology* 12, 1994, 456–463, a Griffiths a kol., *Methods in Molecular Biology* 75, 1997, 427–440. Expresní systémy pro kvasinky byly popsány v publikacích Hensimmg a kol., *Antonie van Leeuwenhoek* 67, 1995, 261–279, Bussineu a kol., *Developments in Biological Standardization* 83, 1994, 13–198, Gellissen a kol., *Antonie van Leeuwenhoek* 62, 1992, 79–93, Fleeer, *Current Opinion in Biotechnology* 3, 1992, 486–496, Vedvick, *Current Opinion in Biotechnology* 2, 1991, 742–745; a Buckholz, *Bio/Technology* 9, 1991, 1067–1072. V publikacích podle dosavadního stavu techniky byly expresní vektory popsány ve značném rozsahu. Kromě genu selekčního markeru a replikačního počátku, který zajišťuje replikaci ve vybraném hostiteli, obvykle expresní vektory obsahují bakteriální nebo virový promotor, a ve většině případů také terminační signál transkripcce. Obvykle je alespoň jedno restriční místo nebo polylinker (vícečetné klonovací místo) mezi promotorem a terminačním signálem, což dovozuje vložit kódující sekvenci DNA. Jestliže je aktivní ve vybraném hostitelském organismu, může se jako promotorová sekvence užít DNA přirozeně kontrolující transkripci odpovídajícího genu. Tuto sekvenci je možné zaměnit jinou promotorovou sekvencí. Je také možné užít promotor, který umožňuje konstitutivní expresi genu a nebo indukovatelný promotor, který umožňuje cílenou regulaci exprese genu ležícího po směru transkripcce („downstream“). Bakteriální a virové promotorové sekvence těchto vlastností jsou z dosa-

vadního stavu techniky známy, přičemž byly popsány v různých publikacích. Regulační sekvence pro expresi v mikroorganismech (jako je *E. coli* nebo *S. cerevisiae*) byly dostatečně popsány v publikacích podle dosavadního stavu techniky. Promotory, které dovolují zvláště silnou expresi „downstream“ ležícího genu jsou např. T7 promotor (Studier a kol., *Methods in Enzymology* 185, 1990, 60–89); lacuv5, trp, trp-lacUV5 (DeBoer a kol., in Rodriguez and Chamberlain, *Promoters, Structure and Function*, Praeger, New York, 1982, 462–481; DeBoer a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 21–25, 2. pl. rac (Boros et al., *gene* 42, 1986, 97–100). Obvykle je množství proteinu nejvyšší v úseku od středu ke konci logaritmické fáze růstového cyklu mikroorganismu. Z tohoto důvodu se výhodně užívají indukovatelné promotory při syntéze proteinů. To často umožňuje vyšší produkci než užití konstitutivního promotoru. Použití silného konstitutivního promotoru často vede, prostřednictvím permanentní transkripce a translace klonovaného genu, ke ztrátě energie na jiné nezbytné buněčné funkce, což pak zpomaluje růst buněk (Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak, *Molekulare Biotechnologie*, 1995, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, str. 342). Aby tedy bylo dosaženo optimálního množství proteinu, často se užívá dvoufázový proces. Nejprve se hostitelské buňky kultivují v optimálních podmínkách, dokud se nedosáhne relativně vysoké hustoty buněk. Ve druhé fázi je indukována transkripce v závislosti na tom, jaký byl použit promotor. Zvláště vhodný je v takovém případě promotor tac indukovatelný laktózou nebo IPTG (=izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) (DeBoer a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1983, 21–25). Terminační signály transkripce byly v dosavadním stavu techniky také dostatečně popsány.

Transformaci hostitelské buňky odpovídající DNA, která kóduje protein, lze provést standardním postupem, jaký je například popsán v publikaci Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Kultivace hostitelských buněk se provádí v živném médiu, které odpovídá nutričním požadavkům použitých hostitelských buněk, zejména pokud jde o pH, teplotu, koncentrace solí, provzdušňování média, přítomnost antibiotik, vitaminů, stopových prvků apod.

Purifikace enzymu produkovaného hostitelskými buňkami se provádí obvyklými purifikačními technikami jako je precipitace, iontová výměnná chromatografie, afinitní chromatografie, gelová filtrace, HPLC s reverzní fází apod.

Modifikací DNA, která je exprimována v hostitelských buňkách, je možné v hostitelských buňkách exprimovat takový polypeptid, který se snáze izoluje z kultivačního média díky určitým vlastnostem, takže je například možné exprimovat protein jako fúzní protein s další polypeptidovou sekvencí, jejíž specifické vazebné vlastnosti dovolují izolovat fúzní protein pomocí afinitní chromatografie (viz např. Hopp a kol., *Biotechnology* 6, 1988, 1 204–1 210, Sassenfeld, *Trend in Biotechnol.* 8, 1990, 88–93).

Pro expresi v rostlinných buňkách jsou výhodné regulační prvky promotoru B33 patatinového genu. Dalším výhodným promotorem je promotor 35S CaMV a promotor genu pro alkoholdehydrogenázu ze *Saccharomyces cerevisiae*.

Vektory podle vynálezu mohou obsahovat další funkční jednotky, které stabilizují vektor v hostitelském organismu, například bakteriální replikační počátek nebo 2-mikron-DNA pro stabilizaci v *S. cerevisiae*. Kromě toho mohou obsahovat levou a pravou hraniční sekvenci T-DNA z *Agrobacterium*, což umožňuje stabilní integraci do genomu rostlin.

Vektory podle vynálezu mohou dále obsahovat funkční terminátory, jako je například terminátor z genu oktopinsyntázy z *Agrobacterium*.

Podle dalšího provedení je nukleová kyselina podle vynálezu spojena s molekulou nukleové kyseliny vektoru podle vynálezu, kdy nukleová kyselina kóduje funkční signální sekvence, aby bylo možné směřovat produkt do různých buněčných kompartmentů. Taková modifikace může například spočívat v tom, že se přidá N- koncová sekvence pro sekreci do apoplastu vyšších rost-

lin, ale v rozsahu vynálezu je také jakákoliv další modifikace vedoucí k fúzi signálního peptidu se sekvencí kódující FFT. Molekula nukleové kyseliny obsažená ve vektoru podle vynálezu může zejména obsahovat sekvence kódující aminokyselinové sekvence způsobující sekreci. V této souvislosti je výhodné užití signálního peptidu α -CGTázy z *Klebsiela oxytoca* M5A1 (Fiedler a kol., *J. Mol. Biol.* 256, 1996, 279-291) nebo signálního peptidu, který je kódován nukleotidy 11 529 až 11 618 sekvence vedené v GeneBank pod číslem X86014.

Zvláště výhodné provedení vynálezu se týká plazmidů p35-csFFT a p33-csFFT a jejich konstrukce, která je popsána v příkladech.

V dalším provedení se vynález týká hostitelských buněk, které přechodně nebo stabilně obsahují molekuly nukleové kyseliny nebo vektory podle vynálezu nebo pocházejí z takových buněk. Hostitelskou buňkou se rozumí organismus, který je schopen vnesení *in vitro* rekombinantní DNA a pak je případně schopen syntetizovat proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu. Hostitelské buňky jsou prokaryotické nebo eukaryotické buňky. Výhodně jsou to mikroorganismy. Výhodně podle vynálezu jde o bakterie a protista (jako jsou houby, zejména kvasinky a řasy), jak jsou definovány například v Schlegelově „Allgemeine Mikrobiologie“ (Georg Thieme Verlag, 1985, 1-2). V souvislosti s prokaryotickými hostitelskými organismy je třeba poznamenat, že byl ukázán pozitivní účinek inulinu na růst určitých mikroorganismů, jako jsou například bifidobakterie z lidského intestinálního traktu. Bifidobakteriím se přisuzuje zdravotní účinek (viz např. Gibson a kol., *Int. Sugar J.* 96, 1994, 381-386; Roberfroid a kol., *J. of Nutrition* 128, 1998, 11-19). Byl také diskutován inhibiční účinek na nádory (viz například publikace Reddy a kol., *Carcinogenesis* 18, 1987, 1371-1374; Singh a kol., *Carcinogenesis* 18, 1997, 833-841). Z tohoto důvodu hostitelské buňky podle vynálezu, jako jsou kvasinky (pekařské) nebo bakterie mléčného kvašení (jogurt, podmáslí) jsou vhodné pro použití v potravinářském průmyslu.

Ve zvláště výhodném provedení podle vynálezu hostitelská buňka navíc obsahuje gen kódující sacharózafruktosyltransferázu (SST) závislou na sacharóze. Takové sekvence byly například izolovány z artyčoku (německá patentová přihláška DE-A1 197 08 774), *Cichorium intibus* (de Halleux a kol., *Plant Physiol.* 113, 1997, 1003-1013), *Helianthus tuberosus* (WO 96/21023) a *Allium cepa* (Vijn a kol., *Plant Physiol.* 117, 1998, 1507-1513).

Vynález se zejména týká transgenních rostlinných buněk transformovaných nukleovými kyselinami podle vynálezu nebo jejich deriváty nebo částmi. Transgenní rostlinné buňky jsou výhodně schopné syntetizovat enzymy vhodné pro produkci inulinu s dlouhým řetězcem díky faktu, že do nich byly vneseny vektorové systémy podle vynálezu, jejich deriváty nebo části. Buňky podle vynálezu jsou výhodně charakterizovány tím, že do nich zavedená molekula nukleové kyseliny podle vynálezu je buď heterologní vzhledem k transformované buňce, tj. v těchto buňkách se přirozeně nevyskytuje, nebo je v genomu lokalizována na jiném místě, než příslušná přirozeně se vyskytující sekvence. Navíc transgenní buňky podle vynálezu výhodně obsahují sekvenci DNA kódující SST.

Předkládaný vynález se rovněž týká proteinů kódovaných molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, a také způsobů jejich produkce, kdy se hostitelské buňky podle vynálezu kultivují za podmínek umožňujících syntézu proteinu. Protein se pak izoluje z pěstovaných buněk a/nebo kultivačního média. Kromě toho se vynález týká FFT, připravitelné z hostitelských buněk podle vynálezu nebo způsobem podle vynálezu.

Předkládaný vynález se dále týká molekul nukleových kyselin, které specificky hybridizují s molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu, s molekulou k ní komplementární nebo s její částí. Výhodně se jedná o oligonukleotidy s délkou nejméně 10, zejména nejméně 15 a výhodně nejméně 50 nukleotidů. Oligonukleotidy podle vynálezu se mohou využít jako primery v PCR reakci. Mohou sloužit také jako složky „antisense“ konstruktů nebo DNA molekul, které kódují vhodné ribozymy.

Předkládaný vynález se také týká způsobu přípravy transgenních rostlinných buněk, rostlinných pletiv a rostlin, kterýžto způsob obsahuje vnesení molekuly nukleové kyseliny nebo vektoru podle vynálezu do rostlinné buňky, rostlinného pletiva nebo rostliny.

5

10 Tím, že předkládaný vynález poskytuje nukleové kyseliny podle vynálezu, dovoluje pomocí metod rekombinantní DNA produkovat inulin s dlouhým řetězcem v různých organismech, zejména v rostlinách, což dosud klasickými šlechtitelskými metodami nebylo možné. Zvýšením aktivity FFT, například nadměrnou expresí („overexpresí“) vhodných molekul nukleové kyseliny podle vynálezu nebo poskytnutím mutantů, které již nadále nepodléhají buněčně specifickým regulačním mechanismům a/nebo které mají změněné teplotní závislosti vzhledem k jejich aktivita-
tě, je možné zvýšit výtěžek v rostlinách modifikovaných genetickým inženýrstvím.

15

Je tudíž také možná exprese molekul nukleové kyseliny podle vynálezu v rostlinných buňkách ke zvýšení aktivity příslušné FFT nebo ke vnesení FFT do buněk, které normálně tento enzym neexprimují. Nadto je možné modifikovat molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu metodami odborníkům z oboru známými, aby se získala FFT podle vynálezu, která již nadále nepodléhá buněčně specifickým regulačním mechanismům nebo která má modifikovanou teplotní závislost nebo specifickou k substrátu či produktu.

20

Pro tento účel může odborník v oboru použít řadu různých rostlinných transformačních systémů. Tak například použití T-DNA pro transformaci rostlinných buněk bylo extenzivně zkoumáno a je popsáno například v patentu EP-A-120 516 a dále v publikaci *Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Chapter V, Fraley, Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 and An, EMBO J. 4 (1985), 277-287.*

25

Pro přenos DNA do rostlinných buněk se rostlinné explantáty společně kultivují (kokultivují) s *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Agrobacterium rhizogenes*. Z infikovaného rostlinného materiálu (například segmentů listů, stonku nebo kořenu, ale také z protoplastů nebo suspenzní buněčné kultury) lze regenerovat celou rostlinu ve vhodném médiu, které obsahuje antibiotika nebo biocidní látky vhodné pro selekci transformovaných buněk. Rostliny připravené takovým způsobem se pak musí testovat, aby se zjistilo, zda je přítomna vnesená DNA. Jinou možností je vnesení DNA do rostlinných buněk biolistickou metodou nebo transformací protoplastů, což je z dosavadního stavu techniky známo (viz například *Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi Volume Comprehensive Treatise (H. J. Rehm, G. Reed, A. Piñhler, P. Stadler, editors), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York Basel Cambridge.*

35

Alternativním systémem pro transformaci jednoděložných rostlin je transformace biolistickou metodou, elektricky nebo chemicky indukovaným příjmem DNA do protoplastů, elektroporací částečně permeabilizovaných buněk, makroinjekcí DNA do květů, mikroinjekcí DNA do mikrospor nebo proembrya metodou bobtnání (viz např. *Lusardi, Plant J. 5, 1994, 571-582; Paszkowski, Biotechnology 24, 1992, 387-392*). Zatímco transformace dvouděložných rostlin vektorovým systémem založeným na Ti-plazmidu prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* je již dávno zavedenou technikou, novější studie ukazují, že transformace vektory založenými na *Agrobacterium tumefaciens* může být úspěšně použita i v případě jednoděložných rostlin (*Chan a kol., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei a kol., Plant J. 6 (1994), 271-282; Bytebier a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 5345-5349; Raineri a kol., Bio/Technology 8 (1990), 3338; Gould a kol., Plant Physiol. 95 (1991), 426-434; Mooney a kol., Plant, Cell Tiss. & Org. Cult. 25 (1991), 209-218; Li a kol., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 1037-1048*).

50

Tři z výše jmenovaných systémů pro transformaci byly úspěšně zavedeny také pro různé druhy obilovin: elektroporace rostlinného pletiva, transformace protoplastů a přenos DNA ostřelováním regenerovatelné tkáně a buněk (přehled viz *Jahne a kol., Euphytica 85 (1995), 3544*). V odborné literatuře bylo popsáno několik způsobů transformace pšenice (přehledy viz. *Maheshwari a kol., Critical Reviews in Plant Science 14 (2) (1995), 149-178*).

55

Jestliže jsou molekuly nukleové kyseliny exprimovány v rostlinách, může být syntetizovaný protein lokalizován v principu v jakémkoliv kompartmentu rostlinné buňky. Aby se dosáhlo lokalizace ve specifickém kompartmentu, musí být odstraněna sekvence zaručující lokalizaci ve vakuole, a je-li nutné, zbylá kódující oblast musí být spojena se sekvencemi DNA zaručujícími lokalizaci ve specifickém kompartmentu. Takové sekvence jsou odborníkovi známy (viz např. *Braun et al., EMBO J.*, 11, 1992, 3219–3227; *Wolter a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1988, 846–850; *Sonnwald a kol., Plant J.*, 1, 1991, 95–106, *Rocha-Sosa, EMBO J.* 8, 1989, 23–29).

Předkládaný vynález se tudíž také týká transgenních rostlinných buněk, rostlinných pletiv a rostlin, které byly transformovány jednou nebo několika molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu, a také transgenních rostlinných buněk pocházejících z takových transformovaných buněk. Takové buňky obsahují jednu nebo několik molekul nukleové kyseliny podle vynálezu, které jsou výhodně spojeny s regulačními DNA prvky zaručujícími transkripci v rostlinných buňkách, zejména s promotorem. Takové rostlinné buňky se odlišují od přirozeně se vyskytujících rostlinných buněk tím, že obsahují alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny podle vynálezu, která se v těchto buňkách přirozeně nevyskytuje, nebo tím, že tato molekula je vložena do genomu buňky na místo, kde se přirozeně nevyskytuje, tj. do jiné genomové oblasti. Jelikož 1–kestóza je přirozeným substrátem FFT a sama je tvořena v reakci fruktosyltransferázy (SST) závislé na sacharóze se sacharózou, je zvláště výhodné a pravděpodobně do konce nutné poskytnout, kromě molekul nukleové kyseliny, vektoru a FFT podle vynálezu, také SST. Takže výhodné provedení vynálezu se týká transgenních rostlinných buněk, rostlinných pletiv a rostlin, které navíc obsahují gen kódující fruktosyltransferázu (SST) závislou na sacharóze. To mohou být například rostliny nebo rostlinné buňky, které již přirozeně exprimují SST jako např. čekanka, *Helianthus tuberosus* nebo jirčina, a nebo rostliny, do kterých byla sekvence DNA kódující SST vnesena metodami genového inženýrství. Tyto sekvence je možné vnést navzájem nezávisle nebo současně s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu.

Z transgenních rostlinných buněk mohou být regenerovány celé rostliny použitím metod odborníků známých. Rostliny připravitelné regenerací transgenních rostlinných buněk podle vynálezu jsou také předmětem předkládaného vynálezu. Dalším předmětem vynálezu jsou rostliny obsahující transgenní rostlinné buňky popsané výše. Transgenní rostliny mohou být v podstatě rostliny jakéhokoli rostlinného druhu, tj. jak jednoděložné, tak dvouděložné. Výhodně jsou to plodiny, zejména rostliny, které obsahují sacharózu, jako jsou rýže, kukuřice, cukrová řepa, cukrová třtina, brambory a zelenina (rajčata, karotka, pór, čekanka apod.), krmné nebo luční trávy, sladké brambory, pšenice, ječmen, řepka a sója.

Vynález se také týká množitelského materiálu a produktů sklizně rostlin podle vynálezu, například ovoce, semen, hlíz, podnoží, sadby, řízků, kalusů, buněčných kultur apod.

Dále se vynález týká inulinu s dlouhým řetězcem, který lze získat z hostitelských buněk podle vynálezu, zejména z transgenních rostlinných buněk, rostlinných pletiv nebo rostlin, a také z jejich množitelského materiálu nebo sklizňových produktů.

V dalším provedení se vynález týká způsobů produkce inulinu, které byly definovány výše.

Izolace inulinu z různých zdrojů, zejména rostlinných pletiv, byla například popsána v publikacích *Gibson a kol., Int. Sugar J.* 96, 1994, 381–386, *Baxa, Czech J. Food Sci.* 16, 1998, 72–76, a dále v EP-A-787 745, *DeLeenheer, Cyrbolhydr. Org. Raw Matter III, Workshop, 1996, Meeting date 1994*, 67–92, *Verlag VCH Weinheim, Germany*, a ruský patent RU 20011621 C1.

Předkládaný vynález se dále týká způsobu *in vitro* produkce inulinu s dlouhým řetězcem využitím sacharózy a kombinace enzymu SST a enzymu FFT podle vynálezu. Dále se vynález týká způsobu *in vitro* produkce inulinu užitím směsi obsahující fruktosylové oligomery a FFT podle vynálezu. V této souvislosti je třeba uvést, že fruktosylový oligomer je oligomer složený z fruktó-

zových jednotek s DP přibližně 2 až 7, který může mít na koncích glukózové zbytky. Když se provádí způsob podle vynálezu, užívají se výhodně rekombinantně produkované proteiny, které jsou tvořeny tak, že se vloží DNA kódující příslušný protein do hostitelské buňky a tam se exprimuje. Protein je pak izolován buďto z hostitelských buněk nebo z kultivačního média. Hostitelské buňky jsou výhodně hostitelské buňky podle vynálezu definované v předchozím textu. Ve výhodném provedení způsobu podle vynálezu se užijí enzymy, které byly připraveny rekombinantní technologií a secernovány z hostitelských buněk do kultivačního média, takže není nutné narušovat buňky nebo dále purifikovat protein, neboť secernovaný protein lze snadno získat ze supernatantu. Aby se odstranila rezidua kultivačního média, užijí se obvyklé způsoby jako je dialýza, reverzní osmóza, chromatografické metody apod. To samé platí pro koncentrování proteinu vylučovaného do média. Sekrece proteinů mikroorganismy je normálně zprostředkována N-koncovým signálním peptidem (signální sekvence, vedoucí peptid). Proteiny se signální sekvencí mohou procházet membránou mikroorganismu. Sekrece proteinů lze dosáhnout spojením sekven-
 ce DNA kódující signální peptid s odpovídajícím úsekem kódujícím enzym. Zvláště výhodné je použití signálního peptidu α -CGTázy z *Klebsiella oxytoca* M5A1 (Fielder a kol., *J. Mol. Biol.* 256, 1996, 279–291) nebo signálního peptidu, který je kódován nukleotidy 11 529 až 11 618 sekven-
 ce uložené v GeneBank pod č. X86014.

Enzymy použité v postupu podle vynálezu mohou být alternativně připraveny nikoliv využitím mikroorganismů, ale užitím *in vitro* transkripčních a translačních systémů, které umožňují exprimovat protein. Ve zvláště výhodném provedení vynálezu je FFT produkována v protoplastech z listového pletiva rostlin.

Dále se vynález týká inulinu produkovaného hostitelskou buňkou, zejména rostlinnou buňkou, pletivem nebo rostlinou podle vynálezu, nebo získaného z rozmnožovacího materiálu nebo produktů sklizně rostlin nebo rostlinných buněk podle vynálezu nebo získaných výše popsaným způsobem podle vynálezu. Takový inulin se může výhodně použít pro přípravu surfaktantů ke zvýšení viskozity ve vodných systémech, jako detergent, jako suspenzační činidlo nebo pro urychlení sedimentačního procesu a komplexování a pro vázání vody.

Jednotlivá provedení podle vynálezu a další provedení jsou odborníkům v oboru zřejmá. Tato provedení jsou obsažena v popisu příkladů podle vynálezu. Další odborná literatura týkající se výše popsaných postupů, prostředků nebo použití, který lze využít ve smyslu předkládaného vynálezu, je obsažena ve stavu techniky, např. ve veřejných knihovnách nebo v elektronické podobě. Veřejnou databází je například databáze Medline, na kterou je přístup prostřednictvím internetu na adrese: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>.

Další obdobné databáze jsou odborníkům známy a jejich adresy lze získat pomocí internetu například na adrese: <http://www.lycos.com>.

Přehled informačních zdrojů týkajících se biotechnologických patentů a patentových přihlášek lze nalézt v publikaci Berks, *Tibtech* 12, 1994, 352–364.

45 Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 (ukazuje analýzu celkového extraktu z protoplastu pomocí HPLC. Protoplasty byly transformovány různými vektory: A: Transformace byla provedena vektorem pA7, který neobsahuje kódující úsek fúzovaný s promotorem cAMV 358. B: Transformace byla provedena vektorem pA7–csFFT, který obsahuje kódující úsek fruktan:fruktosyltransferázy z artyčoku fúzovaný s promotorem cAMV 358. C: Transformace byla provedena vektorem pA7–htFFT, který obsahuje kódující úsek fruktan:fruktosyltransferázy z *Helianthus tuberosus* fúzovaný s promotorem cAMV 358. Před analýzou byly úplné extrakty z protoplastů inkubovány ve směsi fruktosylových oligomerů po dobu 12 hodin. Analýza byla provedena jak je popsáno v příkladu 1.

Obrázek 2 ukazuje konstrukci plazmidu p35–csFFT.

Obrázek 3 ukazuje HPLC analýzu transgenních rostlin, které byly připraveny transformací konstruktem p35–csFFT. Analýza ukázala, že se tvořily molekuly inulinu s dlouhým řetězcem v transgenních rostlinách, které exprimovaly SST a také FFT z artyčoku (35S–SST/FFT 22/19).

Obrázek 4 ukazuje konstrukci plazmidu p33–csFFT.

Obrázek 5 ukazuje HPLC analýzu transgenních rostlin, které byly připraveny transformací konstruktem p33–csFFT. Analýza ukázala, že se tvořily molekuly inulinu s dlouhým řetězcem v transgenních rostlinách, které exprimovaly SST a také FFT z artyčoku (35S–SST/FFT 47).

Předkládaný vynález je dále podrobněji ilustrován pomocí následujících příkladů.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Identifikace, izolace a charakterizace cDNA kódující fruktosyltransferázu z artyčoku (*Cynara scolymus*)

Celková RNA byla izolována z češule (*receptaculum*) artyčoku (*Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989*). Poly(A)⁺ mRNA se izolovala za použitím RNA izolačního systému PolyATtract (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*). Komplementární DNA (cDNA) se syntetizovala z 5 µg této RNA pomocí soupravy pro syntézu „ZAP cDNA synthesis kit“ od firmy Stratagene podle instrukcí výrobce. Získalo se 2×10^6 nezávislých rekombinantních fágů. Amplifikovaná cDNA knihovna se testovala obvyklými metodami pomocí fragmentu DNA značeného P a odpovídajícího cDNA pro SST z artyčoku (NotI fragment z plazmidu pCy21 podle DE 197 08 774.4). Sekvence SST z artyčoku byla popsána v patentové přihlášce DE 197 08 774.4. Pozitivní klony byly screenovány pomocí sondy SST v silně stringentních podmínkách. Klony reagující pozitivně ve screeningu byly vynechány, neboť se evidentně jednalo o SST cDNA. Ze zbývajících klonů byly izolovány inzerty cDNA tak, že se plazmidová DNA izolovaná standardním postupem vyštěpila restrikčním enzymem NotI a pak byla klonována do vektoru pA7. Kohezní konce NotI fragmentu byly zaplněny užitím T4 polymerázy. Poté byl fragment ligován do míst SmaI v pA7. Vektor pA7 je derivátem pUC18 (Yanish–Perron, *gene* 33, 1985, 103–119), který obsahuje vložený promotor 35 S z viru mozaiky kvěťáku, CaMV (nukleotidy 7146 až 7464, dle Gardner, *Nucl. Acids Res.* 9, 1981, 2871–2888) mezi místa EcoRI a SacI v polylinkeru. Kromě promotoru 35S obsahuje vektor pA7 polyadenylační signál genu 3 z T–DNA Ti plazmidu pTiACH5 (Gielen, *EMBO J.* 3, 1984, 835–846), tj. nukleotidy 11 749 až 11 939), který byl izolován jako fragment PvuII–HindIII z plazmidu pAGV40 (Herrera–Strella, *Nature* 303, 1983, 209–213) a klonován mezi místa SphI a HindIII polylinkeru po adici linkeru SphI k místu PvuII.

Protoplasty tabáku byly transformovány užitím derivátů pA7 obsahujících cDNA z artyčoku, a sice metodou, kterou popsal Negruțiu, *Plant Mol. Biol.* 8, 1987, 363–373. Transformované protoplasty byly kultivovány v médiu K3 (Nagy a Maliga, *Z. Pflanzezenphysiologie* 78, 1976, 453–455) při 25 °C po dva dny ve tmě. Pak byly získány buněčné extrakty opakovaným zmrazením a roztátím. Extrakty byly inkubovány 12 hodin s oligofruktany (67,5 % l–ketóza, 28,4 % nystóza, 3,6 % fruktosylnystóza, 0,5 % sacharóza) při 28 °C a pak analyzovány užitím HPLC. Analýzy HPLC byly provedeny na aniontové výměnné koloně CarboPac PA 100, napojené na gradientový chromatografický systém Dionex DX–300 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Monomery, oligomery a polymery cukrů byly stanoveny pomocí pulzampérometrické detekce. Nastavení detektoru pro tento účel bylo následující: $T_1 = 0,48$ s, $T_2 = 0,12$ s, $T_3 = 0,12$ s, $E_1 = 0,05$ V,

$E_2 = 0,65 \text{ V}$, $E_3 = -0,95 \text{ V}$, citlivost $0,1 \mu\text{C}$, integrace = $0,28$ až $0,48 \text{ s}$, průtokové médium A $0,15\text{M NaOH}$, průtokové médium B = 1M NaAc v $0,15\text{M NaOH}$, gradient: 10 minut 100% A, 2 minuty lineární zvýšení z 0% B na 100% B, 2 minuty 100% B, 2 minuty lineární zvýšení z 0% A na 100% A, 5 minut A. Vzorky byly před aplikací odsoleny a filtrovány (Microcon 10, Amicon, Beverly, USA). Průtoková rychlost byla 1 ml min^{-1} . V několika extraktech (viz obr. 1) byl nalezen vysokomolekulární inulin.

Příklad 2

10

Sekvenční analýza inzertu cDNA plazmidu pCy3

Inzert cDNA z derivátu pA7 (pCy3), který byl zodpovědný za syntézu vysokomolekulárního inulinu v testu s protoplasty, byl sekvenčován obvyklou dideoxynukleotidovou metodou (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1977, 5463–5467).

Inzert klonu pCy21 je DNA velikosti 2 073 bp. Nukleotidová sekvence je zde uvedena jako sekvence id. č. 1. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena jako sekvence id. č. 2. Sekvence id. č. 3 je varianta sekvence id. č. 1, která kóduje stejný protein jako sekvence id. č. 1.

20

Sekvenční analýza a srovnání s již publikovanými sekvencemi ukázaly, že sekvence uvedená jako sekvence id. č. 1 je nová a obsahuje kódující úsek vykazující homologii s FFT jiných organismů.

25

Příklad 3

Syntéza plazmidu p35–csFFT a vložení plazmidu do genomu bramboru

Plazmid p35–csFFT (obr. 2) obsahuje tři fragmenty A, B a C v binárním vektoru pBin19 (Bevan, 1984, Nucl. Acids Res., 12: 8711, modifikováno podle Becker, 1990, Nucl. Acids Res., 18: 203).

Fragment A obsahuje promotor 35S z viru mozaiky kvěťáku (CaMV). Obsahuje úsek nukleotidů 7146 až 7464 (Gardner, Nucl. Acids Res. 9, 1981, 2871–2888), který je vložen mezi štěpná místa EcoRI a SacI polylinkeru z pBin19–Hyg.

35

Fragment B obsahuje nukleotidy 1 až 2073 sekvence id. č. 1. Fragment B byl získán jako fragment NotI z vektoru pBK–CMV, ve kterém byl vložen do štěpného místa EcoRI prostřednictvím linkerové sekvence EcoRI/NotI.

40

Fragment C obsahuje polyadenylační signál genu 3 z T–DNA Ti plazmidu pTi ACH 5 (Gielen et al., 1984; EMBO J., 3, 835–846), nukleotidy 11 749 až 11 939, který byl izolován jako fragment PvuII–HindIII z plazmidu pAGV 40 (Herrera–Estrella et al., 1983, Nature, 303, 209–213) a klonován mezi štěpná místa SphI a HindIII polylinkeru z pBin19–Hyg po přidání linkerů SphI ke štěpnému místu PvuII.

45

Plazmid p35–csSST byl vnesen do *Agrobacterium* (Höfgen a Willmitzer, Nucleic Acids Res., 16, 1988, 9877) a pak byl zaveden do rostlin bramboru prostřednictvím genového přenosu zprostředkovaného *Agrobacterium* užitím výše popsaných v oboru známých metod. Tyto rostliny bramboru byly transformovány sekvencí DNA kódující SST z artyčoku (viz německá patentová přihláška DE A1 197 08 774) a exprimují sekvenci pod kontrolou promotoru 35S. Celé rostliny byly regenerovány z transformovaných buněk. Z listů regenerovaných rostlin byly získány extrakty a ty byly testovány na přítomnost fruktosylových polymerů. Analýzy se prováděly postupem popsaným v příkladu 1. Analýzy listů velkého počtu rostlin transformovaných tímto vektorem

50

nepochybně prokázaly výskyt vysokomolekulárního inulinu, který je důsledkem exprese genu FFT artyčoku obsaženém v plazmidu p35-csFFT (srov. obr. 3).

5 Tabulka 1

Analýza obsahu inulinu v hlízách transgenních rostlin bramboru exprimujících geny SST a FFT z artyčoku

Rostlina	obsah fruktanu μmol fruktózy/g čerstvé hmotnosti	průměrný stupeň polymerizace (poměr fruktóza/glukóza)
35-SST/FFT 22/26	30,81	21 (20/1)
35-SST/FFT 36/17	27,34	20 (19/1)

10

Příklad 4

15 Příprava plazmidu p33-csFFT a vnesení plazmidu do genomu bramboru

Plazmid p33-csFFT (obr. 4) je shodný s plazmidem p35-csFFT, s výjimkou toho, že fragment A obsahuje promotor B33 patatinového genu b33 z bramboru místo promotoru 35 S CaMV. Obsahuje fragment DraI (pozice -1 512 až pozice +14) patatinového genu B33 (Rocha-Sosa et al., 20 1989, EMBO J., 8: 23-29), který byl vložen mezi štěpná místa EcoRI a SacI polylinkeru z pBin19-Hyg.

Plazmid p33-csFFT byl vnesen do rostlin bramboru pomocí genového přenosu zprostředkovaného *Agrobacterium*, jak bylo již popsáno v příkladu 3. Tyto rostliny bramboru byly transformovány sekvencí DNA kódující SST z artyčoku (viz německá patentová přihláška 25 DE A1 197 08 774) a exprimují sekvenci pod kontrolou promotoru 35S. Celé rostliny byly regenerovány z transformovaných buněk.

Analýzy hlíz velkého počtu rostlin transformovaných tímto vektorem nepochybně prokázaly 30 výskyt vysokomolekulárního inulinu, který je výsledkem exprese genu FFT z artyčoku obsaženého v p33-csFFT (srov. obr. 5).

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2073 páru báží
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 21...1872

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 1:

TTACCTCATT TCCATCAACC ATG AGA ACG ACT GAA CCC CAA ACT GAC CTT	50
Met Arg Thr Thr Glu Pro Gln Thr Asp Leu	
1 5 10	
GAG CAT GCA CCC AAC CAC ACT CCA CTA CTG GAC CAC CCC GAA CCA CCA	98
Glu His Ala Pro Asn His Thr Pro Leu Leu Asp His Pro Glu Pro Pro	
15 20 25	
CCG GCC GCC GTG AGA AAC CGG TTG TTG ATT AGG GTT TCG TCC AGT ATC	146
Pro Ala Ala Val Arg Asn Arg Leu Leu Ile Arg Val Ser Ser Ser Ile	
30 35 40	
ACA TTG GTC TCT CTG TTT TTT GTT TCA GCA TTC CTA CTC ATT CTC CTG	194
Thr Leu Val Ser Leu Phe Phe Val Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Leu	
45 50 55	
TAC CAA CAC GAT TCC ACT TAC ACC GAT GAT AAT TCA GCA CCG TCG GAA	242
Tyr Gln His Asp Ser Thr Tyr Thr Asp Asp Asn Ser Ala Pro Ser Glu	
60 65 70	
AGT TCT TCC CAG CAG CCC TCC GCT GCC GAT CGC CTG AGA TGG GAG AGA	290
Ser Ser Ser Gln Gln Pro Ser Ala Ala Asp Arg Leu Arg Trp Glu Arg	
75 80 85 90	
ACA GCT TTT CAT TTC CAG CCC GCC AAA AAT TTC ATT TAT GAT CCC AAC	338
Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asn	
95 100 105	
GGT CCA TTG TTC CAT ATG GGT TGG TAC CAT CTT TTC TAC CAA TAC AAC	386
Gly Pro Leu Phe His Met Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn	
110 115 120	

CCG TAC GCA CCG TTT TGG GGC AAC ATG ACA TGG GGT CAC GCC GTG TCC Pro Tyr Ala Pro Phe Trp Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser 125 130 135	434
AAA GAC ATG ATC AAC TGG TTC GAG CTT CCG ATC GCC TTG GCC CCA ACC Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr 140 145 150	482
GAA TGG TAC GAT ATC GAG GGT GTT TTA TCA GGC TCA ACC ACG ATC CTC Glu Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu 155 160 165 170	530
CCT GAT GGT CGA ATC TTT GCT CTC TAT ACC GGA AAC ACA AAC GAT CTC Pro Asp Gly Arg Ile Phe Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu 175 180 185	578
GAG CAA CTT CAA TGC AAA GCC GTG CCA GTT AAT GCA TCC GAC CCA CTT Glu Gln Leu Gln Cys Lys Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu 190 195 200	626
CTT GTT GAA TGG GTC AGG TAC GAT GCT AAC CCG ATC CTG TAT GCT CCA Leu Val Glu Trp Val Arg Tyr Asp Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro 205 210 215	674
TCA GGG ATC GGG TTA ACA GAT TAC CGG GAC CCG TCA ACA GTT TGG ACG Ser Gly Ile Gly Leu Thr Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr 220 225 230	722
GGT CCC GAT GGA AAA CAT CGG ATG ATC ATA GGG ACT AAA CGA AAT ACT Gly Pro Asp Gly Lys His Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr 235 240 245 250	770
ACA GGA CTC GTA CTT GTA TAC CAT ACC ACC GAT TTC ACA AAC TAC GTA Thr Gly Leu Val Leu Val Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val 255 260 265	818
ATG TTG GAC GAG CCG TTG CAC TCG GTC CCC AAC ACT GAT ATG TGG GAA Met Leu Asp Glu Pro Leu His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu 270 275 280	866
TGT GTC GAC CTT TAC CCT GTG TCA ACG ACC AAC GAT AGT GCA CTT GAT Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp 285 290 295	914
GTT GCG GCC TAT GGT CCG GGT ATC AAG CAT GTG CTT AAA GAA AGT TGG Val Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp 300 305 310	962
GAG GGA CAC GCG ATG GAC TTT TAC TCG ATC GGG ACA TAC GAT GCA TTT Glu Gly His Ala Met Asp Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe 315 320 325 330	1010

AAC GAT AAG TGG ACA CCC GAT AAT CCC GAA CTA GAC GTC GGT ATC GGG Asn Asp Lys Trp Thr Pro Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly 335 340 345	1058
TTG CCG TGC GAT TAC GGA AGG TTC TTT GCG TCG AAG AGC CTC TAC GAC Leu Arg Cys Asp Tyr Gly Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp 350 355 360	1106
CCG TTG AAG AAA CGA AGA GTC ACT TGG GGT TAT GTT GCG GAA TCC GAC Pro Leu Lys Lys Arg Arg Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp 365 370 375	1154
AGT TAC GAC CAA GAC GTC TCT AGA GGA TGG GCT ACT ATT TAT AAT GTT Ser Tyr Asp Gln Asp Val Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val 380 385 390	1202
GCA AGG ACC ATT GTA CTC GAT CCG AAG ACT GGA ACC CAT CTA CTT CAA Ala Arg Thr Ile Val Leu Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln 395 400 405 410	1250
TGG CCG GTG GAG GAA ATC GAG AGC TTG AGA TCC AAC GGT CAT GAA TTC Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe 415 420 425	1298
AAA AAT ATA ACA CTT GAG CCG GGC TCG ATC ATT CCC CTC GAC GTA GGC Lys Asn Ile Thr Leu Glu Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly 430 435 440	1346
TCA GCT ACG CAG TTG GAC ATC GTT GCA ACA TTT GAG GTG GAT CAA GAG Ser Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu 445 450 455	1394
GCG TTA AAA GCA ACA AGT GAC ACG AAC GAC GAA TAC GGT TGC ACC ACA Ala Leu Lys Ala Thr Ser Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr 460 465 470	1442
AGT TCG GGT GCA GCC AAA GGG GAA GTT TTG GAC CAT TCG GGG ATT GCA Ser Ser Gly Ala Ala Lys Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala 475 480 485 490	1490
GTT CTT GCC CAC GGA ACC CTT TCG GAG TTA ACT CCG GTG TAT TTC TAC Val Leu Ala His Gly Thr Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr 495 500 505	1538
ATT GCT AAA AAC ACC AAG GGA GGT GTG GAT ACA CAT TTT TGT ACG GAT Ile Ala Lys Asn Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp 510 515 520	1586

AAA CTA AGG TCA TCA TAT GAT TAT GAT GGT GAG AAG GTG GTG TAT GGC Lys Leu Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly 525 530 535	1634
AGC ACC GTC CCA GTG CTC GAC GGC GAA GAA TTC ACA ATG AGG ATA TTG Ser Thr Val Pro Val Leu Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu 540 545 550	1682
GTG GAT CAT TCG GTG GTG GAG GGG TTT GCA CAA GGG GGA AGG ACA GTA Val Asp His Ser Val Val Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val 555 560 565 570	1730
ATA ACG TCA AGA GTG TAT CCC ACG AAA GCA ATA TAC GAA GCA GCC AAG Ile Thr Ser Arg Val Tyr Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys 575 580 585	1778
CTT TTC GTC TTC AAC AAT GCC ACT ACG ACC AGT GTG AAG GCG ACT CTC Leu Phe Val Phe Asn Asn Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu 590 595 600	1826
AAG GTC TGG CAA ATG TCT CAA GCC TTT GTC AAG GCT TAT CCG TTT T Lys Val Trp Gln Met Ser Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe 605 610 615	1872
AGTTTTTTTAT GCATCTTTTT AAGACATTGT TGTTCATAT GATTCAAGTT TTATCTGTGT	1932
GTTATGTTAA GACACGCAGC TTAAAATAGC CACATGTGAG ATCATTGCG TATGGCCGTC	1992
AACTATTTTT TAATATGCAA CTTCAGTAAT GCTATTTACA GTATGTTTTA AGGAAAAAAA	2052
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	2073

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 617 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyseliný
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 2:

Met	Arg	Thr	Thr	Glu	Pro	Gln	Thr	Asp	Leu	Glu	His	Ala	Pro	Asn	His	1	5	10	15
Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Val	Arg	Asn	20	25	30	
Arg	Leu	Leu	Ile	Arg	Val	Ser	Ser	Ser	Ile	Thr	Leu	Val	Ser	Leu	Phe	35	40	45	
Phe	Val	Ser	Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gln	His	Asp	Ser	Thr	50	55	60	
Tyr	Thr	Asp	Asp	Asn	Ser	Ala	Pro	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Pro	65	70	75	80
Ser	Ala	Ala	Asp	Arg	Leu	Arg	Trp	Glu	Arg	Thr	Ala	Phe	His	Phe	Gln	85	90	95	
Pro	Ala	Lys	Asn	Phe	Ile	Tyr	Asp	Pro	Asn	Gly	Pro	Leu	Phe	His	Met	100	105	110	
Gly	Trp	Tyr	His	Leu	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Pro	Tyr	Ala	Pro	Phe	Trp	115	120	125	
Gly	Asn	Met	Thr	Trp	Gly	His	Ala	Val	Ser	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Trp	130	135	140	
Phe	Glu	Leu	Pro	Ile	Ala	Leu	Ala	Pro	Thr	Glu	Trp	Tyr	Asp	Ile	Glu	145	150	155	160
Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Ile	Leu	Pro	Asp	Gly	Arg	Ile	Phe	165	170	175	
Ala	Leu	Tyr	Thr	Gly	Asn	Thr	Asn	Asp	Leu	Glu	Gln	Leu	Gln	Cys	Lys	180	185	190	
Ala	Val	Pro	Val	Asn	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Leu	Val	Glu	Trp	Val	Arg	195	200	205	
Tyr	Asp	Ala	Asn	Pro	Ile	Leu	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	Leu	Thr	210	215	220	
Asp	Tyr	Arg	Asp	Pro	Ser	Thr	Val	Trp	Thr	Gly	Pro	Asp	Gly	Lys	His	225	230	235	240
Arg	Met	Ile	Ile	Gly	Thr	Lys	Arg	Asn	Thr	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Val	245	250	255	
Tyr	His	Thr	Thr	Asp	Phe	Thr	Asn	Tyr	Val	Met	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	260	265	270	

His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro
 275 280 285

Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp Val Ala Ala Tyr Gly Pro
 290 295 300

Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp Glu Gly His Ala Met Asp
 305 310 315 320

Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe Asn Asp Lys Trp Thr Pro
 325 330 335

Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Cys Asp Tyr Gly
 340 345 350

Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Pro Leu Lys Lys Arg Arg
 355 360 365

Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp Ser Tyr Asp Gln Asp Val
 370 375 380

Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val Ala Arg Thr Ile Val Leu
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Glu Ile
 405 410 415

Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe Lys Asn Ile Thr Leu Glu
 420 425 430

Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly Ser Ala Thr Gln Leu Asp
 435 440 445

Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu Ala Leu Lys Ala Thr Ser
 450 455 460

Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ala Ala Lys
 465 470 475 480

Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala Val Leu Ala His Gly Thr
 485 490 495

Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asn Thr Lys
 500 505 510

Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp Lys Leu Arg Ser Ser Tyr
 515 520 525

Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly Ser Thr Val Pro Val Leu
 530 535 540

Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu Val Asp His Ser Val Val
545 550 555 560

Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Ile Thr Ser Arg Val Tyr
565 570 575

Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Phe Val Phe Asn Asn
580 585 590

Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu Lys Val Trp Gln Met Ser
595 600 605

Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe
610 615

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2073 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 21 .. 1872

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 3:

TTACCTCATT TCCATCAACC ATG AGA ACG ACT GAA CCC CAA ACT GAC CTT	50
Met Arg Thr Thr Glu Pro Gln Thr Asp Leu	
620 625	
GAG CAT GCA CCC AAC CAC ACT CCA CTA CTG GAC CAC CCC GAA CCA CCA	98
Glu His Ala Pro Asn His Thr Pro Leu Leu Asp His Pro Glu Pro Pro	
630 635 640	
CCG GCC GCC GTG AGA AAC CCG TTG TTG ATT AGG GTT TCG TCC AGT ATC	146
Pro Ala Ala Val Arg Asn Arg Leu Leu Ile Arg Val Ser Ser Ser Ile	
645 650 655	
ACA TTG GTC TCT CTG TTT TTT GTT TCA GCA TTC CTA CTC ATT CTC CTG	194
Thr Leu Val Ser Leu Phe Phe Val Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu Leu	
660 665 670 675	
TAC CAA CAC GAT TCC ACT TAC ACC GAT GAT AAT TCA GCA CCG TCG GAA	242
Tyr Gln His Asp Ser Thr Tyr Thr Asp Asp Asn Ser Ala Pro Ser Glu	
680 685 690	
AGT TCT TCC CAG CAG CCC TCC GCT GCC GAT CGC CTG AGA TGG GAG AGA	290
Ser Ser Ser Gln Gln Pro Ser Ala Ala Asp Arg Leu Arg Trp Glu Arg	
695 700 705	
ACA GCT TTT CAT TTC CAG CCC GCC AAA AAT TTC ATT TAT GAT CCC AAC	338
Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asn	
710 715 720	
GGT CCA TTG TTC CAT ATG GGT TGG TAC CAT CTT TTC TAC CAA TAC AAC	386
Gly Pro Leu Phe His Met Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn	
725 730 735	

CCG TAC GCT CCC TTT TGG GGA AAC ATG ACT TGG GGA CAT GCC GTC AGT Pro Tyr Ala Pro Phe Trp Gly Asn Met Thr Trp Gly His Ala Val Ser 740 745 750 755	434
AAG GAT ATG ATA AAT TGG TTT GAA TTA CCG ATA GCC TTA GCG CCA ACT Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe Glu Leu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Thr 760 765 770	482
GAG TGG TAC GAC ATA GAA GGT GTT CTG AGT GGC AGT ACT ACC ATT TTA Glu Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ile Leu 775 780 785	530
CCT GAC GGA AGA ATT TTC GCT CTC TAC ACC GGA AAT ACA AAC GAC CTC Pro Asp Gly Arg Ile Phe Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Thr Asn Asp Leu 790 795 800	578
GAG CAG CTC CAG TGT AAG GCC GTG CCA GTT AAT GCT AGT GAT CCA TTA Glu Gln Leu Gln Cys Lys Ala Val Pro Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu 805 810 815	626
TTG GTA GAA TGG GTT CGC TAC GAT GCC AAT CCG ATA TTA TAT GCC CCT Leu Val Glu Trp Val Arg Tyr Asp Ala Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Pro 820 825 830 835	674
AGT GGC ATC GGC CTC ACA GAT TAC AGA GAT CCT AGT ACT GTG TGG ACG Ser Gly Ile Gly Leu Thr Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr 840 845 850	722
GGC CCT GAC GGT AAA CAC CGT ATG ATA ATC GGG ACG AAG AGG AAT ACG Gly Pro Asp Gly Lys His Arg Met Ile Ile Gly Thr Lys Arg Asn Thr 855 860 865	770
ACT GGA CTC GTC TTA GTA TAT CAC ACT ACC GAC TTT ACA AAT TAT GTA Thr Gly Leu Val Leu Val Tyr His Thr Thr Asp Phe Thr Asn Tyr Val 870 875 880	818
ATG TTG GAC GAG CCG TTG CAC TCG GTC CCC AAC ACT GAT ATG TGG GAA Met Leu Asp Glu Pro Leu His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu 885 890 895	866
TGT GTC GAC CTT TAC CCT GTG TCA ACG ACC AAC GAT AGT GCA CTT GAT Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp 900 905 910 915	914
GTT GCG GCC TAT GGT CCG GGT ATC AAG CAT GTG CTT AAA GAA AGT TGG Val Ala Ala Tyr Gly Pro Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp 920 925 930	962
GAG GGA CAC GCG ATG GAC TTT TAC TCG ATC GGG ACA TAC GAT GCA TTT Glu Gly His Ala Met Asp Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe 935 940 945	1010

AAC GAT AAG TGG ACA CCC GAT AAT CCC GAA CTA GAC GTC GGT ATC GGG Asn Asp Lys Trp Thr Pro Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly 950 955 960	1058
TTG CGG TGC GAT TAC GGA AGG TTC TTT GCG TCG AAG AGC CTC TAC GAC Leu Arg Cys Asp Tyr Gly Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp 965 970 975	1106
CCG TTG AAG AAA CGA AGA GTC ACT TGG GGT TAT GTT GCG GAA TCC GAC Pro Leu Lys Lys Arg Arg Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp 980 985 990 995	1154
AGT TAC GAC CAA GAC GTC TCT AGA GGA TGG GCT ACT ATT TAT AAT GTT Ser Tyr Asp Gln Asp Val Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val 1000 1005 1010	1202
GCA AGG ACC ATT GTA CTC GAT CGG AAG ACT GGA ACC CAT CTA CTT CAA Ala Arg Thr Ile Val Leu Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln 1015 1020 1025	1250
TGG CCG GTG GAG GAA ATC GAG AGC TTG AGA TCC AAC GGT CAT GAA TTC Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe 1030 1035 1040	1298
AAA AAT ATA ACA CTT GAG CCG GGC TCG ATC ATT CCC CTC GAC GTA GGC Lys Asn Ile Thr Leu Glu Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly 1045 1050 1055	1346
TCA GCT ACG CAG TTG GAC ATC GTT GCA ACA TTT GAG GTG GAT CAA GAG Ser Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu 1060 1065 1070 1075	1394
GCG TTA AAA GCA ACA AGT GAC ACG AAC GAC GAA TAC GGT TGC ACC ACA Ala Leu Lys Ala Thr Ser Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr 1080 1085 1090	1442
AGT TCG GGT CCA GCC AAA GGG GAA GTT TTG GAC CAT TCG GGG ATT GCA Ser Ser Gly Ala Ala Lys Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala 1095 1100 1105	1490
GTT CTT GCC CAC GGA ACC CTT TCG GAG TTA ACT CCG GTG TAT TTC TAC Val Leu Ala His Gly Thr Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr 1110 1115 1120	1538
ATT GCT AAA AAC ACC AAG GGA GGT GTG GAT ACA CAT TTT TGT ACG GAT Ile Ala Lys Asn Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp 1125 1130 1135	1586

AAA CTA AGG TCA TCA TAT GAT TAT GAT GGT GAG AAG GTG GTG TAT GGC Lys Leu Arg Ser Ser Tyr Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly 1140 1145 1150 1155	1634
AGC ACC GTC CCA GTG CTC GAC GGC GAA GAA TTC ACA ATG AGG ATA TTG Ser Thr Val Pro Val Leu Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu 1160 1165 1170	1682
GTG GAT CAT TCG GTG GTG GAG GGG TTT GCA CAA GGG GGA AGG ACA GTA Val Asp His Ser Val Val Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val 1175 1180 1185	1730
ATA ACG TCA AGA GTG TAT CCC ACG AAA GCA ATA TAC GAA GCA GCC AAG Ile Thr Ser Arg Val Tyr Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys 1190 1195 1200	1778
CTT TTC GTC TTC AAC AAT GCC ACT ACG ACC AGT GTG AAG GCG ACT CTC Leu Phe Val Phe Asn Asn Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu 1205 1210 1215	1826
AAG GTC TGG CAA ATG TCT CAA GCC TTT GTC AAG GCT TAT CCG TTT T Lys Val Trp Gln Met Ser Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe 1220 1225 1230	1872
AGTTTTTTTAT GCATCTTTTT AAGACATTGT TGTTTCATAT GATTCAAGTT TTATCTGTGT	1932
GTTATGTTAA GACACGCAGC TTAAAATAGC CACATGTGAG ATCATTGCG TATGGCCGTC	1992
AACTATTTTT TAATATGCAA CTTCACTAAT GCTATTTACA GTATGTTTTA AGGAAAAAAA	2052
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	2073

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 617 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyseliny
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 4:

Met	Arg	Thr	Thr	Glu	Pro	Gln	Thr	Asp	Leu	Glu	His	Ala	Pro	Asn	His	1	5	10	15
Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Val	Arg	Asn	20	25	30	
Arg	Leu	Leu	Ile	Arg	Val	Ser	Ser	Ser	Ile	Thr	Leu	Val	Ser	Leu	Phe	35	40	45	
Phe	Val	Ser	Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Tyr	Gln	His	Asp	Ser	Thr	50	55	60	
Tyr	Thr	Asp	Asp	Asn	Ser	Ala	Pro	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Pro	65	70	75	80
Ser	Ala	Ala	Asp	Arg	Leu	Arg	Trp	Glu	Arg	Thr	Ala	Phe	His	Phe	Gln	85	90	95	
Pro	Ala	Lys	Asn	Phe	Ile	Tyr	Asp	Pro	Asn	Gly	Pro	Leu	Phe	His	Met	100	105	110	
Gly	Trp	Tyr	His	Leu	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Pro	Tyr	Ala	Pro	Phe	Trp	115	120	125	
Gly	Asn	Met	Thr	Trp	Gly	His	Ala	Val	Ser	Lys	Asp	Met	Ile	Asn	Trp	130	135	140	
Phe	Glu	Leu	Pro	Ile	Ala	Leu	Ala	Pro	Thr	Glu	Trp	Tyr	Asp	Ile	Glu	145	150	155	160
Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Ile	Leu	Pro	Asp	Gly	Arg	Ile	Phe	165	170	175	
Ala	Leu	Tyr	Thr	Gly	Asn	Thr	Asn	Asp	Leu	Glu	Gln	Leu	Gln	Cys	Lys	180	185	190	
Ala	Val	Pro	Val	Asn	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Leu	Val	Glu	Trp	Val	Arg	195	200	205	
Tyr	Asp	Ala	Asn	Pro	Ile	Leu	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	Leu	Thr	210	215	220	
Asp	Tyr	Arg	Asp	Pro	Ser	Thr	Val	Trp	Thr	Gly	Pro	Asp	Gly	Lys	His	225	230	235	240
Arg	Met	Ile	Ile	Gly	Thr	Lys	Arg	Asn	Thr	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Val	245	250	255	
Tyr	His	Thr	Thr	Asp	Phe	Thr	Asn	Tyr	Val	Met	Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	260	265	270	

His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro
 275 280 285

Val Ser Thr Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp Val Ala Ala Tyr Gly Pro
 290 295 300

Gly Ile Lys His Val Leu Lys Glu Ser Trp Glu Gly His Ala Met Asp
 305 310 315 320

Phe Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Phe Asn Asp Lys Trp Thr Pro
 325 330 335

Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Cys Asp Tyr Gly
 340 345 350

Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Pro Leu Lys Lys Arg Arg
 355 360 365

Val Thr Trp Gly Tyr Val Ala Glu Ser Asp Ser Tyr Asp Gln Asp Val
 370 375 380

Ser Arg Gly Trp Ala Thr Ile Tyr Asn Val Ala Arg Thr Ile Val Leu
 385 390 395 400

Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Glu Ile
 405 410 415

Glu Ser Leu Arg Ser Asn Gly His Glu Phe Lys Asn Ile Thr Leu Glu
 420 425 430

Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Val Gly Ser Ala Thr Gln Leu Asp
 435 440 445

Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Glu Ala Leu Lys Ala Thr Ser
 450 455 460

Asp Thr Asn Asp Glu Tyr Gly Cys Thr Thr Ser Ser Gly Ala Ala Lys
 465 470 475 480

Gly Glu Val Leu Asp His Ser Gly Ile Ala Val Leu Ala His Gly Thr
 485 490 495

Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asn Thr Lys
 500 505 510

Gly Gly Val Asp Thr His Phe Cys Thr Asp Lys Leu Arg Ser Ser Tyr
 515 520 525

Asp Tyr Asp Gly Glu Lys Val Val Tyr Gly Ser Thr Val Pro Val Leu
 530 535 540

Asp Gly Glu Glu Phe Thr Met Arg Ile Leu Val Asp His Ser Val Val
 545 550 555 560

Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val Ile Thr Ser Arg Val Tyr
 565 570 575

Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Phe Val Phe Asn Asn
 580 585 590

Ala Thr Thr Thr Ser Val Lys Ala Thr Leu Lys Val Trp Gln Met Ser
 595 600 605

Gln Ala Phe Val Lys Ala Tyr Pro Phe
 610 615

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Molekula nukleové kyseliny kódující protein s enzymatickou aktivitou fruktosyltransferázy (FFT) vedoucí k syntéze vysokomolekulárních fruktanových polymerů, jejichž molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, přičemž molekula nukleové kyseliny je vybrána ze skupiny zahrnující:
 - 10 (a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako id. č. 2 a id. č. 4;
 - (b) molekuly nukleové kyseliny obsahující kódující sekvenci uvedenou jako id. č. 1 nebo id. č. 3, nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci;
 - 15 (c) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci přinejmenším z 80 % identickou s kódující sekvencí uvedenou v id. č. 1;
 - (d) molekuly nukleové kyseliny kódující protein obsahující aminokyselinovou sekvenci přinejmenším z 85 % identickou s aminokyselinovou sekvencí uvedenou v id. č. 2; a
 - 20 (e) molekuly nukleové kyseliny obsahující fragment nukleotidové sekvence z částí (a), (b), (c) nebo (d).
- 25 2. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, která obsahuje nukleotidovou sekvenci z více než 90 % identickou s kódující sekvencí uvedenou v id. č. 1.
- 3 3. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde aminokyselinová sekvence kódovaného proteinu je z více než 90 % identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2.
- 30 4. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde aminokyselinová sekvence kódovaného proteinu je z více než 95 % identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2.
- 5 5. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde aminokyselinová sekvence kódovaného proteinu je z více než 97 % identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2.
- 35 6. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, kde aminokyselinová sekvence kódovaného proteinu je z více než 99 % identická s aminokyselinovou sekvencí id. č. 2.
- 40 7. Molekula nukleové kyseliny podle nároků 1 až 6, kterou je molekula DNA.
8. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 7, kterou je molekula cDNA.
9. Molekula nukleové kyseliny podle některého z nároků 1 až 6, kterou je molekula RNA.
- 45 10. Molekula nukleové kyseliny podle některého z nároků 1 až 9, která pochází z artyčku.
11. Vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10.
- 50 12. Vektor podle nároku 11, kde molekula nukleové kyseliny je operativně spojena s regulačními prvky, které zajišťují transkripci a syntézu translatovatelné RNA v prokaryotických a/nebo eukaryotických buňkách.
13. Vektor podle nároku 12, kde regulační prvky jsou odvozeny z promotoru B33 genu patatinu nebo promotoru 35S CaMV.
- 55

14. Hostitelská buňka transformovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13, nebo buňka, která je odvozena z takové buňky, kde tyto odvozené buňky obsahují uvedenou molekulu nukleové kyseliny nebo
5 uvedený vektor.

15. Hostitelská buňka podle nároku 14, která navíc obsahuje gen kódující sacharózofruktosyl-transferázu (SST) závislou na sacharóze.

16. Způsob přípravy FFT, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že hostitelské buňky podle nároku 14 se kultivují v podmínkách, které umožňují syntézu FFT, a pak se FFT izoluje z kultivovaných buněk a/nebo kultivačního média.

17. FFT kódovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, nebo připravená způsobem podle nároku 16.

18. Způsob přípravy transformovaných hostitelských buněk podle nároku 14 nebo 15, zejména transgenních rostlinných buněk, transgenních rostlinných pletiv a transgenních rostlin. **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje krok, kdy se vnese molekula nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10 nebo vektor podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13 do hostitelské buňky, rostlinné buňky, rostlinného pletiva nebo rostliny.

19. Transformovaná hostitelská buňka, transgenní rostlinná buňka, rostlinné pletivo nebo rostlina, které obsahují molekulu nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, nebo vektor podle kteréhokoliv z nároků 11 až 13, nebo které jsou připravitelné způsobem podle nároku 18, nebo které jsou odvozeny z takových buněk, pletiv nebo rostlin, kde uvedená odvozená buňka, pletivo nebo rostlina obsahuje uvedenou molekulu nukleové kyseliny nebo uvedený vektor.

20. Transformovaná hostitelská buňka, transgenní rostlinná buňka, rostlinné pletivo nebo rostlina podle nároku 19, které navíc obsahují gen kódující sacharózofruktosyl-transferázu (SST) závislou na sacharóze.

21. Rostlina obsahující rostlinné buňky nebo rostlinné pletivo podle nároku 19 nebo 20.

22. Rostlina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 21, kterou je užitková rostlina.

23. Rostlina podle nároku 22, kde užitková rostlina je rostlina obsahující sacharózu.

24. Množitelský materiál rostlin podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, obsahující rostlinné buňky podle nároku 19 nebo 20.

25. Sklizňové produkty rostlin podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, obsahující rostlinné buňky podle nároku 19 nebo 20.

26. Způsob výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje

(a) kultivaci transformované hostitelské buňky, transgenní rostlinné buňky nebo rostlinného pletiva podle nároku 19 nebo 20, nebo rostliny podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23 za podmínek, které umožňují tvorbu FFT a přeměnu 1-kestózy, případně dodávané zvenčí, nebo ekvivalentního substrátu, na tento vysokomolekulární inulin, a

(b) izolování takto vytvořeného inulinu z kultivovaných buněk, pletiv nebo rostlin nebo z kultivačního média.

27. Způsob výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že zahrnuje

5 (a) přivedení 1-kestózy nebo ekvivalentního substrátu do kontaktu s FFT podle nároku 17 za podmínek, které umožňují přeměnu na tento vysokomolekulární inulin, a

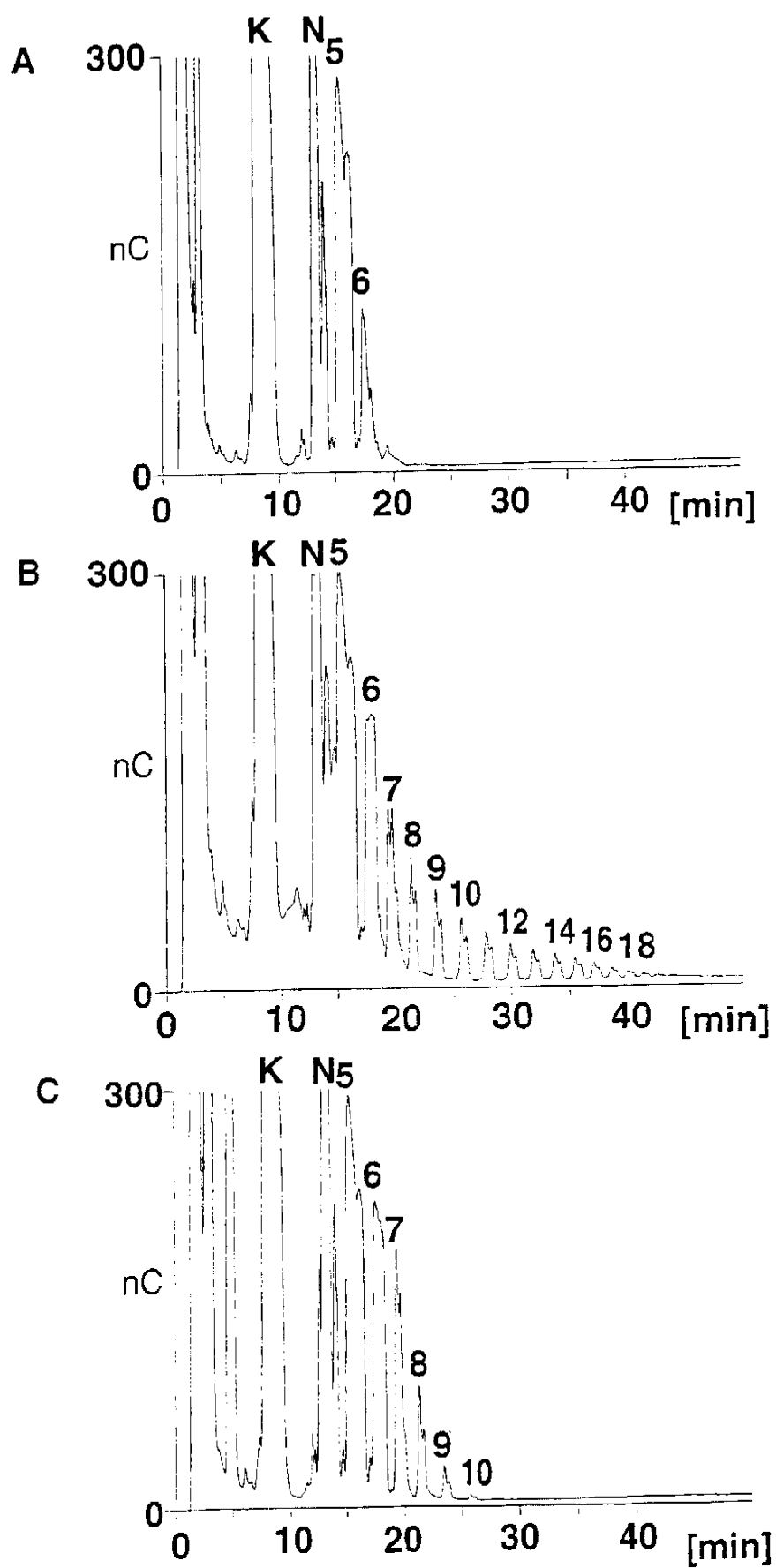
(b) izolování takto vytvořeného inulinu.

10 28. Způsob *in vitro* výroby vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se sacharóza, jakožto substrát, přemění na vysokomolekulární inulin působením kombinace enzymů obsahující SST a FFT podle nároku 17.

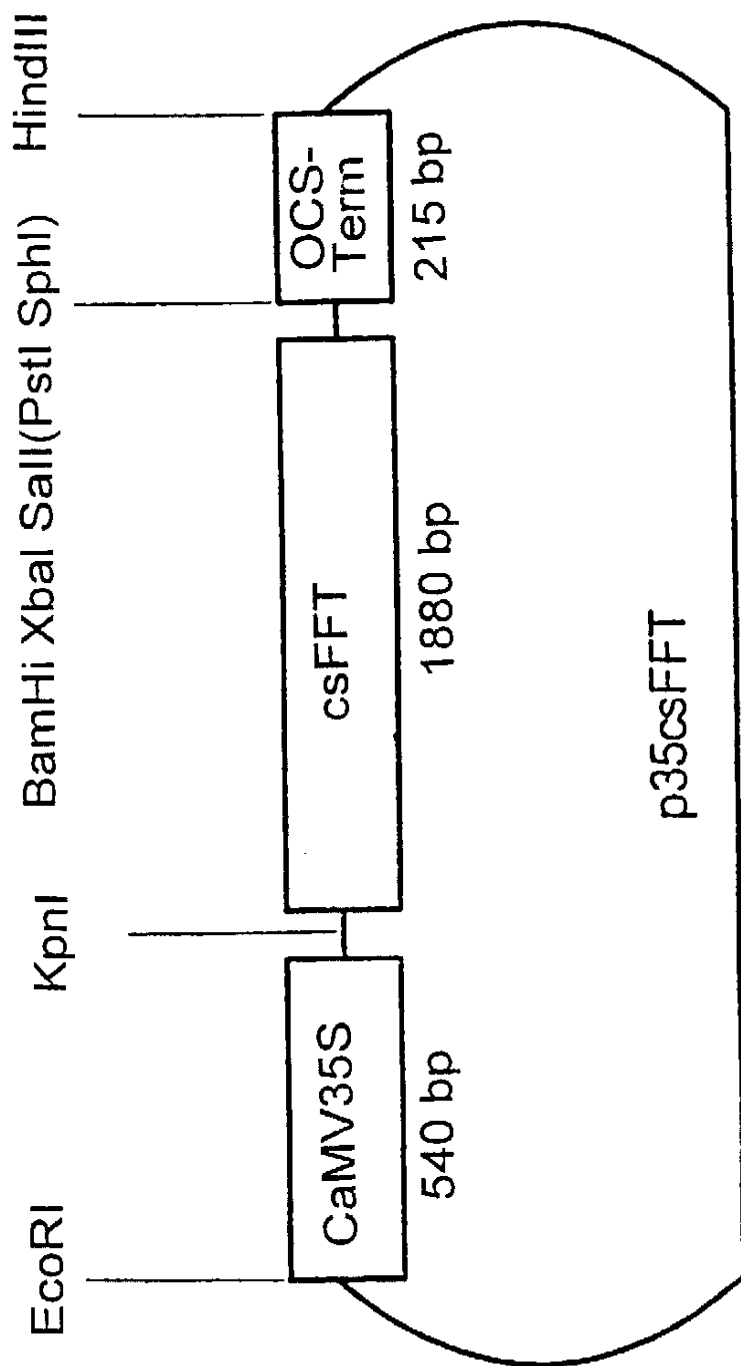
15 29. Použití vysokomolekulárního inulinu, jehož molekuly obsahují v průměru více než 20 fruktosylových zbytků, připravitelného z hostitelské buňky, rostlinné buňky nebo rostlinného pletiva podle nároku 19 nebo 20, z rostliny podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, z množitelského materiálu podle nároku 24, nebo ze sklizňového produktu podle nároku 25, nebo za pomoci způsobu podle kteréhokoliv z nároků 26 až 28 k výrobě surfaktantů ke zvýšení viskozity vodných systémů, jako detergentu, suspenzačního činidla, pro urychlení sedimentace a pro komplexování nebo
20 vázání vody.

25

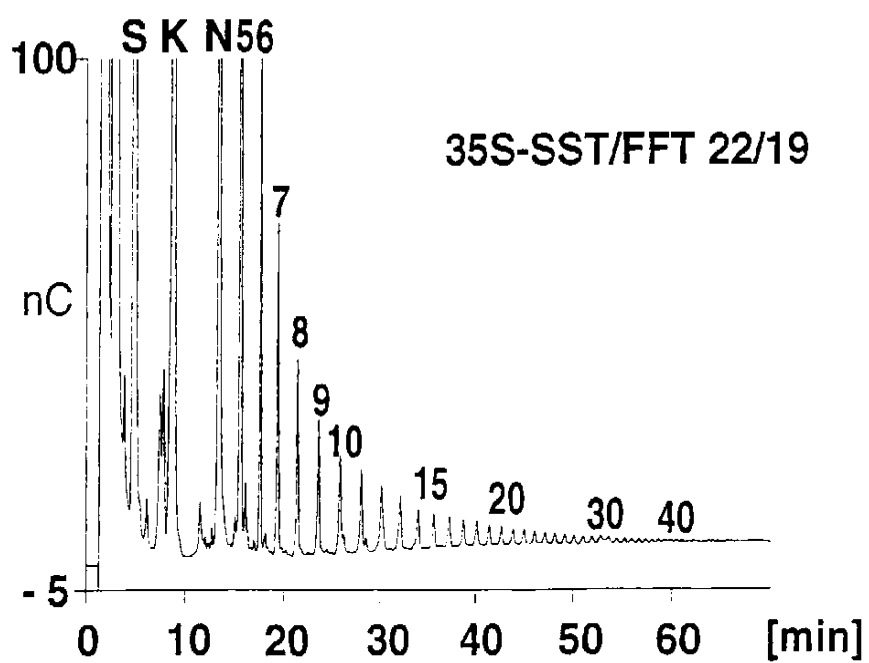
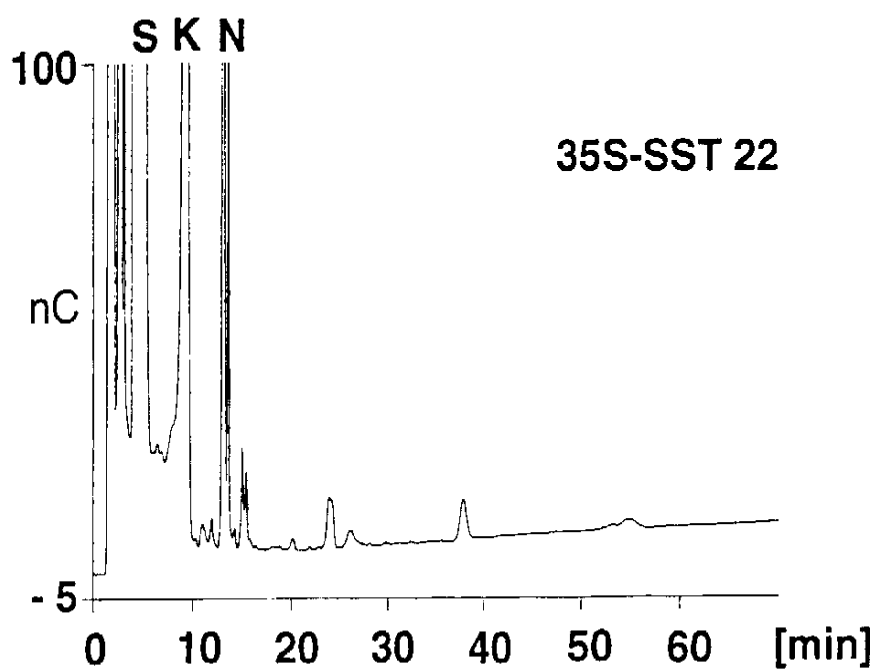
5 výkresů



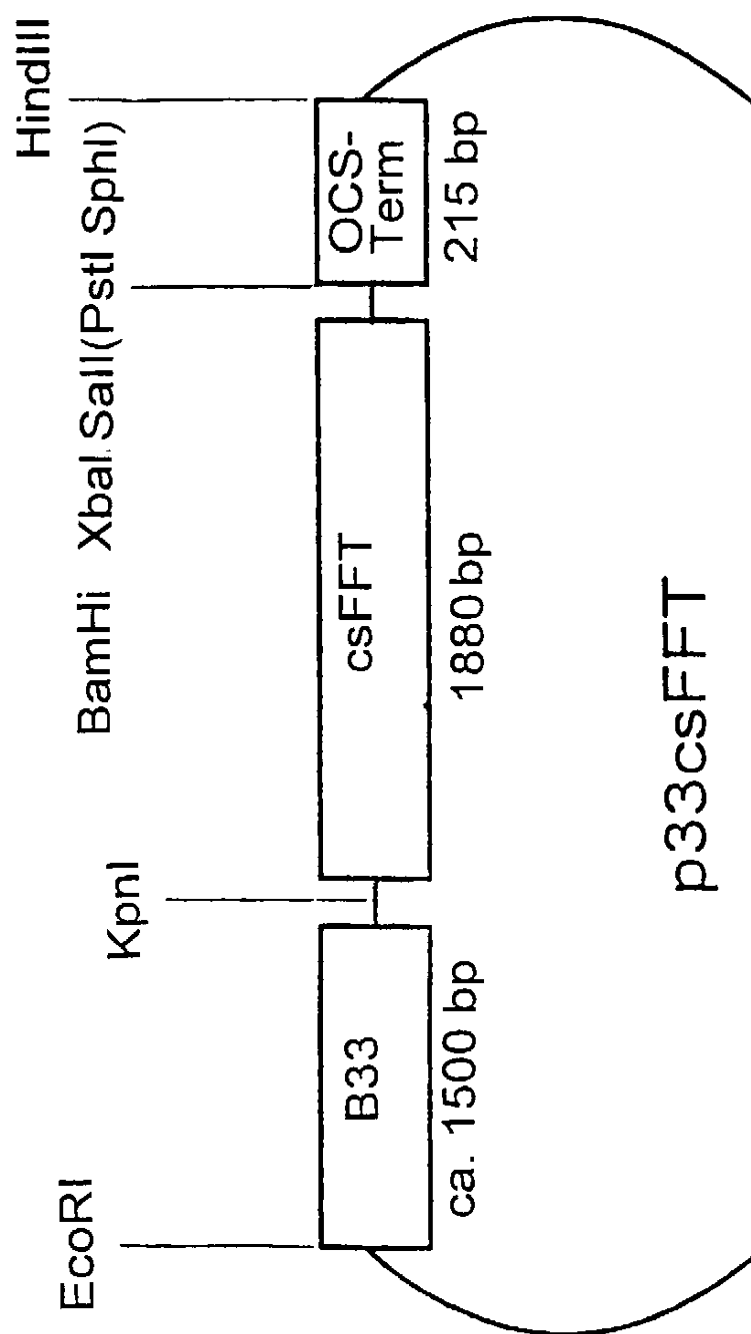
Obr. 1

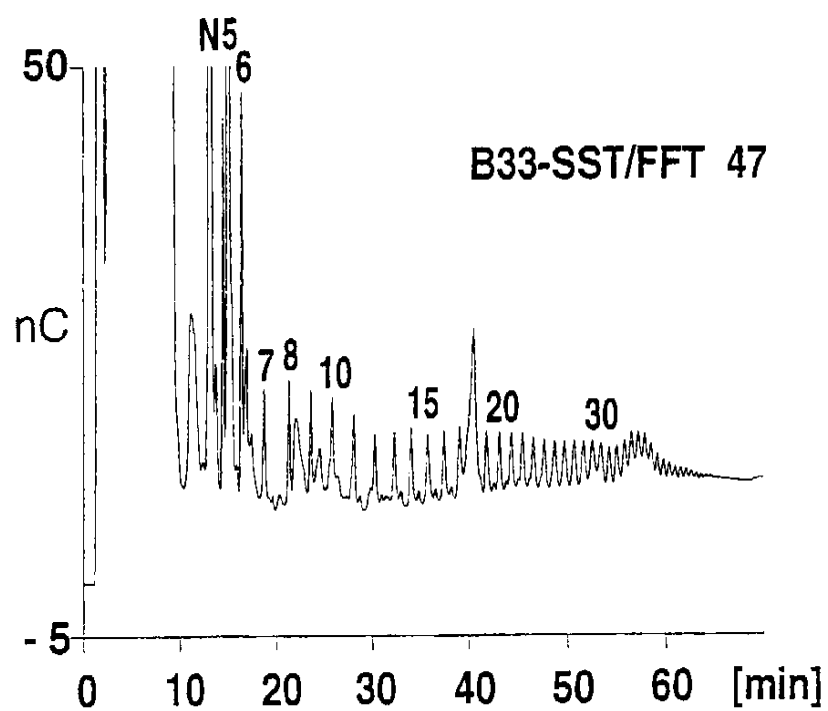
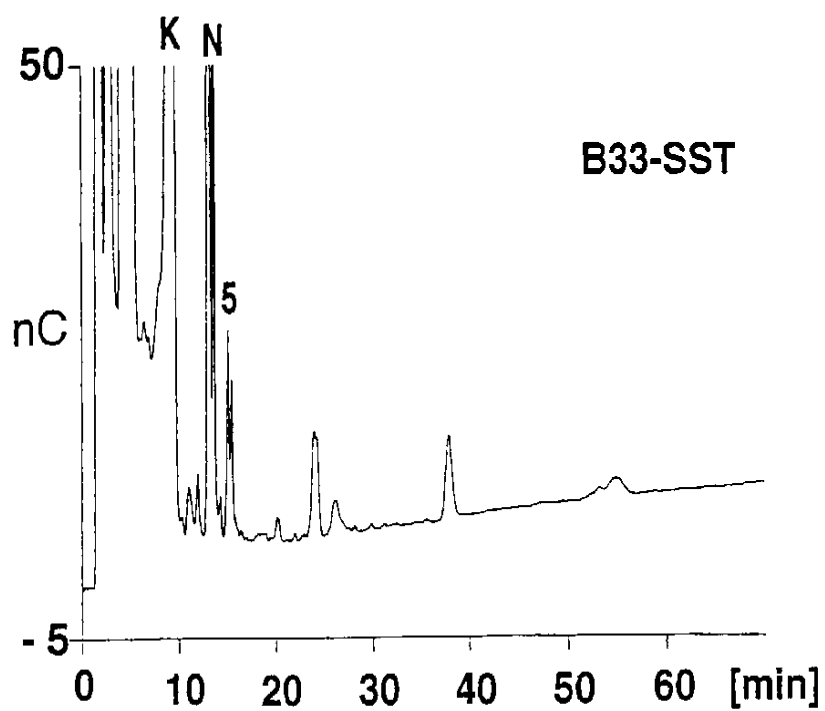


Obr. 2



Obr. 3

**Obr. 4**



Obr. 5

Konec dokumentu